



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/08 (2013.01); A61K 38/10 (2013.01); A61K 31/7088 (2013.01); A61P 37/00 (2013.01)

(21)(22) Заявка: 2016115732, 25.09.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.09.2014

Дата регистрации:
28.05.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
25.09.2013 AU 2013903686

(43) Дата публикации заявки: 30.10.2017 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 28.05.2019 Бюл. № 16

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 25.04.2016

(86) Заявка РСТ:
AU 2014/050249 (25.09.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/042664 (02.04.2015)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

О'ХЕХИР Робин Элизабет (AU),
ПРИКЕТТ Сара Рейчел (AU),
РОЛЛАНД Дженнифер Мэй (AU)

(73) Патентообладатель(и):

АРАВАКС ПТИ ЛТД (AU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 6835824 B1, 28.12.2004. WO
2009022155 A2, 19.02.2009. US 7179645 B2,
20.02.2007. ЕА 19923 В1, 30.07.2014. RU
2429881 С2, 27.09.2011.

(54) НОВАЯ ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии,
в частности к иммуномодулирующей композиции
для лечения состояния, отличающегося
гиперчувствительностью к Ara h 1 и/или Ara h 2.
Также раскрыты способ лечения или
профилактики, с использованием указанной

композиции, и применение указанной композиции
для получения лекарственного средства.
Изобретение обладает способностью эффективно
лечить состояние, отличающееся
гиперчувствительностью к Ara h 1 и/или Ara h 2.
4 н. и 22 з.п. ф-лы, 15 ил., 25 табл., 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 38/08 (2006.01)*A61K 38/10* (2006.01)*A61P 37/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 38/08 (2013.01); A61K 38/10 (2013.01); A61K 31/7088 (2013.01); A61P 37/00 (2013.01)(21)(22) Application: **2016115732, 25.09.2014**(24) Effective date for property rights:
25.09.2014Registration date:
28.05.2019

Priority:

(30) Convention priority:
25.09.2013 AU 2013903686(43) Application published: **30.10.2017 Bull. № 31**(45) Date of publication: **28.05.2019 Bull. № 16**(85) Commencement of national phase: **25.04.2016**(86) PCT application:
AU 2014/050249 (25.09.2014)(87) PCT publication:
WO 2015/042664 (02.04.2015)Mail address:
**129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**OKHEKHIR Robin Elizabet (AU),
PRIKETT Sara Rejchel (AU),
ROLLAND Dzhennifer Mej (AU)**

(73) Proprietor(s):

ARAVAKS PTI LTD (AU)**(54) NOVEL IMMUNOTHERAPEUTIC COMPOSITION AND USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry, in particular to immunomodulatory composition for treating a condition characterized by hypersensitivity to Ara h 1 and/or Ara h 2. Also disclosed is a method of treating or preventing, using said composition, and

using said composition for preparing a drug.

EFFECT: invention has the ability effectively treat a condition characterized by hypersensitivity to Ara h 1 and/or Ara h 2.

26 cl, 15 dwg, 25 tbl, 3 ex

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение в целом относится к иммунотерапевтической композиции. Более конкретно, настоящее изобретение относится к иммунотерапевтической композиции, которая иммунологически взаимодействует с Т-лимфоцитами у субъектов с аллергией на арахис или аллергией на другие древесные орехи. Данная композиция предпочтительно вступает в иммунологическое взаимодействие с Т-клетками у субъектов с аллергией на аллергены Ara h 1 и/или Ara h 2. Композиция согласно настоящему изобретению является применимой в терапевтическом или профилактическом лечении состояний, характеризующихся аномальным, неадекватным или по другим причинам нежелательным иммунным ответом на арахис, Ara h 1, и/или Ara h 2, или их производное или гомолог.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Библиографические детали публикаций, на которые в данном описании делается ссылка по автору, в алфавитном порядке собраны в конце описания.

В данном описании ссылка на любой предшествующий уровень техники не является признанием или какой-либо формой предположения о том, что этот предшествующий уровень техники является частью общедоступных сведений, и не должна признаваться таковой.

Аллергия на арахис является опасным для жизни и неизлечимым расстройством, поражающим примерно 1% всего населения (Husain *et al. J Am Acad Dermatol.* 66(1):136-43, 2012; Burks, *Lancet.* 371(9623):1538-46, 2008). Оно характеризуется внезапным возникновением анафилаксии, которая может наблюдаться при воздействии незначительных количеств белков арахиса (Hourihane *et al., J Allergy Clin Immunol* 100: 596-600, 1997; Pumphrey, *Current Opinion in Allergy & Immunology.* 4(4):285-90, 2004).

Анафилаксия, индуцированная арахисом, наиболее часто ассоциирована с летальным исходом или с опасными для жизни симптомами (Bock *et al. J Allergy Clin Immunol.* 119 (4):1016-8, 2007; Burks 2008, *выше*). Белки арахиса часто являются скрытыми в очевидно безопасных пищевых продуктах, так что случайный контакт случается у вплоть до 50% пациентов в течение 5 лет (Sicherer *et al., Paediatrics* 102: e6, 1998). Неудивительно, что аллергия на арахис и древесные орехи ассоциирована со значительными психологическими трудностями как для пациентов, так и лиц, осуществляющих уход, как и в случае с теми, кто страдает хроническими инвалидизирующими болезнями, такими как ревматоидный артрит (Primeau *et al., Clin Exp Allergy* 30: 1135-43, 2000; Kemp *et al. Med. J. Aust.* 188(9):503-4, 2008). Лечение, первоочередной задачей которого является устранение аллергии на арахис и древесные орехи как причины летального исхода, также является необходимым для устранения хронической психологической отягощенности у субъектов с аллергией на арахис.

К настоящему времени, попытки иммунотерапии аллергии на арахис привели к очень ограниченному успеху. Nelson *et al.* показали, что клиническая десенсибилизация в отношении арахиса может быть индуцирована с применением протокола интенсивной иммунотерапии с нефракционированным экстрактом арахиса, но эта клиническая десенсибилизация утрачивается у примерно половины субъектов при введении поддерживающих доз и, кроме того, эти инъекции ассоциированы с частыми эпизодами анафилаксии у большинства субъектов как на протяжении фазы повышения дозы, так и поддерживающей фазы (Nelson *et al., J Allergy Clin Immunol* 99: 744-51, 1997). Oppenheimer *et al.* продемонстрировали аналогичные результаты в своем исследовании, еще раз показав, что активная терапия с использованием нефракционированного экстракта арахиса ассоциирована с высокой частотой системной анафилаксии. Сбор данных в

этом исследовании был прекращен после введения экстракта арахиса субъекту, рандомизированному в группу плацебо, что в результате привело к его смерти, подчеркивая опасную природу этого состояния (Oppenheimer *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* 90: 256-62, 1992). Недавние исследования пероральной иммунотерапии с использованием

5 муки из цельного арахиса подтверждают, что десенсибилизация является практически осуществимой, но наблюдаемые нежелательные реакции указывают на главные проблемы, связанные с безопасностью (Hofmann *et al.* *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 286, 2009; Jones *et al.* *J. Allergy Clin. Immunol.* 24, 292, 2009; Clark *et al.* *Allergy* 64, 1218, 2009; Varshney *et al.* *J Allergy Clin Immunol.* 127(3):654-60, 2011; Varshney *et al.* *J Allergy Clin*

10 *Immunol.* 124(6):1351-2, 2009; Anagnostou *et al.* *Clin Exp Allergy.* 41(9):1273-81, 2011; Allen & O'Hehir. *Clin Exp Allergy.* 41(9):1172-4, 2011; Yu *et al.* *Int Arch Allergy Immunol.* 159(2): 179-182, 2012; Thyagarajan *et al.* *J Allergy Clin Immunol.* 126(1):31-2, 2010; Blumchen *et al.* *J Allergy Clin Immunol.* 126(1):83-91, 2010). Даже исключая детей, предрасположенных к развитию тяжелых симптомов или астмы, в двух исследованиях сообщалось об

15 анафилактическом шоке, в одном случае при начальной пищевой провокационной пробе (Clark *et al.* *Allergy* 64, 1218, 2009), а в другом - в ходе лечения ребенка, у которого ранее не наблюдалась анафилаксия (Hofmann *et al.* *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 286, 2009).

Разработка новых стратегий для решения проблем, связанных с иммунотерапией

20 аллергеном, зависит от правильного понимания иммунологической основы успешной иммунотерапии, а также ее побочных эффектов. Уже давно было установлено, что осложнения, связанные с иммунотерапией аллергеном, обусловлены перекрестным сшиванием IgE, и что это воздействие не требуется для того, чтобы такая терапия была эффективной (Litwin *et al.*, *Int Arch Allergy Appl Immunol* 87: 361-61, 1998). Также известно,

25 что одним из критически важных для выработки толерантности воздействий традиционной (подкожная инъекция, или сублингвальное, или пероральное введение нефракционированного экстракта аллергена) иммунотерапии является ее способность изменять преобладающий фенотип специфических Т-клеток с Т_H2 на регуляторный фенотип. Эти регуляторные Т-клетки осуществляют воздействие посредством продукции

30 противовоспалительных цитокинов IL-10 и/или TGFβ. (Akdis & Akdis, *J Allergy Clin Immunol.* 123:735-46, 2009; Akdis & Akdis, *Nature Reviews: Drug Discovery.* 8:645-60. 2009; Akdis & Akdis, *J Allergy Clin Immunol.* 127:18-27, 2011).

Ключевое отличие ответа с участием антител и ответа с участием лимфоцитов связано с распознаванием антигена, причем антитела распознают конформационные В-

35 клеточные эпитопы в зависимости от молекулярной третичной структуры, тогда как CD4+ Т-клетки распознают короткие линейные пептиды. На этом отличии по распознаванию антигена основаны многие новые стратегии иммунотерапии, в том числе те, в которых используются пептиды на основе Т-клеточных эпитопов, мутанты В-клеточных эпитопов и измененные пептидные лиганды (Rolland *et al.* *Pharmacology &*

40 *Therapeutics* 121:273-284, 2009). Все эти способы основываются на изменении или отсутствии молекулярной третичной структуры, так что не происходит перекрестное сшивание IgE и активация эффекторных клеток. Пептидная иммунотерапия является способом, для которого существуют доказательства эффективности,

45 задокументированные как в случае аллергии на кошачью перхоть, так и аллергии на пчелиный яд. В трех различных исследованиях показано, что при отсутствии каких-либо системных побочных эффектов можно достичь клинической и иммунологической толерантности к основному аллергену пчелиного яда - фосфолипазе A2 (PLA2) с использованием последовательностей, содержащих Т-клеточный эпитоп (Muller *et al.* *J*

Allergy Clin Immunol. 101: 747-54, 1998; Tarzi *et al. Clin Exp Allergy.* 36: 465-74, 2006; Fellrath *et al. J Allergy Clin Immunol.* 111: 854-61, 2003), тогда как в нескольких исследованиях продемонстрировано, что пептиды на основе структуры основного кошачьего аллергена Fel d 1 можно применять для индукции ослабленных клинических ответов (Norman *et al., Am J Respir Crit Care Med* 154: 1623-8, 1996; Marcotte *et al., J Allergy Clin Immunol* 101: 506-13, 1998; Pene *et al., J Allergy Clin Immunol* 102: 571-8, 1998; Oldfield *et al. Lancet* 360: 47-53, 2002; Alexander *et al. Clin Exp Allergy* 35: 52-8, 2004; Alexander *et al. Allergy* 60:1269-74, 2005). Совсем недавно, в исследовании фазы IIa была подтверждена безопасность, переносимость и потенциальная эффективность смеси семи пептидов из Fel d 1

(Toleromune Cat[®], Cicassia Ltd., Оксфорд, Великобритания) (Worm *et al. J Allergy Clin Immunol.* 127: 89-97, 2011), причем в настоящее время продолжаются исследования фазы IIb (Moldaver & Larche. *Allergy.* 66: 784-91, 2011; Worm *et al. Expert Opin. Investig. Drugs.* 22(10): 1347-1357, 2013). Важным для разработки этих стратегий является удерживание Т-клеточных эпитопов, достаточное для обеспечения возможности индукции изменения фенотипа Т-клеток.

Способность связываться непосредственно с молекулами МНС класса II обеспечивает презентацию пептидов непрофессиональными или незрелыми APC без провоспалительных и костимуляторных сигналов, что способствует индукции толерантности, анергии и/или супрессивной активности в отношении Т-клеток, участвующих в ответе (Moldaver & Larche, *Allergy* 66: 784-91, 2011) и/или других CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют МНС класса II. Это также обеспечивает презентацию этих пептидов с более высокой частотой, чем пептидов, процессированных из целой молекулы (Santambrogio *et al. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96:15056-61), и, поскольку они также являются более безопасными, чем целый аллерген, пептиды можно давать при более высоких концентрациях, таким образом обеспечивая более эффективное изменение Т-клеточных ответов.

Что важно, целенаправленное воздействие на Т-клетки, специфичные в отношении доминантных Т-клеточных эпитопов основных аллергенов, может изменять ответы в отношении цельных экстрактов аллергена (связанная супрессия). Во многих исследованиях, в которых сообщается об успешной пептидной иммунотерапии в мышинных моделях аллергии, продемонстрировано, что введение пептидов на основе доминантных Т-клеточных эпитопов основных аллергенов индуцировало толерантность не только к этим пептидам, но также к очищенному аллергену и цельным экстрактам аллергена (Yang *et al. Clin Exp Allergy* 40(4):668-78, 2010; Yoshitomi *et al. J Pept Sci.* 13(8):499-503, 2007; Marazuela *et al. Mol Immunol.* 45(2):438-45, 2008; Rupa *et al. Allergy.* 67(1): 74-82, 2012; Hoyne *et al. J Exp Med.* 178(5):1783-8, 1993; Hall *et al. Vaccine.* 21(5-6):549-61, 2003).

Следовательно, существует потребность как в идентификации основных аллергенов арахиса, так и, кроме того, в идентификации Т-клеточных эпитопов этих аллергенов. Идентификация, характеристика и анализ этих Т-клеточных эпитопов являются критически важными для разработки специфической иммунотерапевтической или профилактической методики. В связи с этим, несмотря на то, что ранее осуществляли анализ молекул аллергена арахиса Ara h 1 и/или Ara h 2, идентификация коровых участков Т-клеточных эпитопов является необходимой для разработки эффективной вакцины.

В ходе работы, которая привела к настоящему изобретению, были идентифицированы коровые участки доминантных HLA-вырожденных Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и/или Ara h 2. Эта группа коровых участков Т-клеточных эпитопов является уникальной в контексте ее высокого уровня эффективности. В отличие от ранее исследованных 20-

мерных пептидов Ara h 1 и/или Ara h 2, которые были идентифицированы только исходя из их способности демонстрировать некоторый уровень Т-клеточной реактивности, был идентифицирован выбранный набор коровых участков Т-клеточных эпитопов, которые являются иммунодоминантными, по сравнению с другими пептидными
 5 фрагментами Ara h 1 и/или Ara h 2, а также являются HLA-вырожденными в том смысле, что они связываются с двумя или более типами HLA. Более того, многие из этих коровых участков Т-клеточных эпитопов презентируются молекулами HLA-DQ. Молекулы HLA-DQ являются более консервативными в смешанных популяциях, чем молекулы HLA-DR. Следовательно, пептиды, презентируемые на HLA-DQ, обеспечивают более
 10 широкий охват популяции.

С использованием дополнительных данных было определено, что специфическая подгруппа из семи этих пептидов, которые содержат Т-клеточные эпитопы как Ara h 1, так и Ara h 2, обеспечивает особенно эффективные иммунологические результаты. Следовательно, идентификация этой группы пептидов с уникальной эффективностью
 15 обеспечила возможность разработки особенно эффективных терапевтических профилактических способов для лечения состояний, характеризующихся аномальными, неадекватными или по другим причинам нежелательными иммунными ответами на Ara h 1, и/или Ara h 2, или их производное или гомолог, форм аллергии на другие древесные орехи или аллергены в композиции, такой как продукты питания, содержащей молекулы
 20 Ara h 1 и/или Ara h 2.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

По всему данному описанию и в формуле изобретения, изложенной ниже, если исходя из контекста не требуется иное, слово “содержать” и вариации, такие как “содержит” и “содержащий”, следует понимать как подразумевающие включение указанного
 25 единого целого, или стадии, или группы единых целых или стадий, но не исключение какого-либо единого целого, или стадии, или группы единых целых или стадий.

Используемое в данном документе выражение “происходящий из” следует рассматривать как означающее, что конкретное единое целое или группа единых целых берет начало из указанного объекта, но не обязательно непосредственно получена из
 30 указанного источника. Кроме того, используемые в данном документе формы единственного числа включают определяемые объекты во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

Если не указано иное, все технические и научные выражения, используемые в данном документе, имеют такое значение, которое обычно понятно специалисту в области
 35 техники, к которой относится данное изобретение.

Настоящее описание содержит информацию об аминокислотных последовательностях, подготовленную при помощи программы PatentIn версии 3.5, представленную в данном документе после списка цитированной литературы. Каждая аминокислотная последовательность идентифицирована в перечне последовательностей
 40 при помощи цифрового индикатора <210>, за которым следует идентификатор последовательности (например, <210>1, <210>2 и т. д.). Длина, тип последовательности (белок и т. д.) и организм-источник для каждой последовательности указан при помощи информации, представленной в полях цифровых индикаторов <211>, <212> и <213>, соответственно. Аминокислотные последовательности, на которые приведены ссылки
 45 в данном описании, идентифицированы при помощи индикатора SEQ ID NO:, за которым следует идентификатор последовательности (например, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и т. д.). Идентификатор последовательности, на который приведены ссылки в данном описании, соответствует информации, представленной в поле цифрового индикатора

<400> в перечне последовательностей, за которым следует идентификатор последовательности (например, <400>1, <400>2 и т. д.). Таким образом, SEQ ID NO:1, как детально указано в данном описании, соответствует последовательности, указанной как <400>1 в перечне последовательностей.

5 Один аспект настоящего изобретения направлен на иммуномодулирующую композицию, содержащую по меньшей мере пять участков Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня, состоящего из:

- (i) FQNLQNHR (SEQ ID NO:1)
- (ii) IVQIEA (SEQ ID NO:2)
- 10 (iii) NEGVIVKVSK (SEQ ID NO:3)
- (iv) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4)
- (v) EGALML (SEQ ID NO:5)
- (vi) IMPAАНP (SEQ ID NO:6)
- (vii) LRPXEQHLM (SEQ ID NO:7)
- 15 (viii) ENNQRXMXEA (SEQ ID NO:8)

или их функциональных производных или гомологов, где остаток X представляет собой цистеин или серин, и при этом указанная композиция содержит по меньшей мере один участок Т-клеточного эпитопа, выбранный из SEQ ID NO: 1-6, и по меньшей мере один участок Т-клеточного эпитопа, выбранный из SEQ ID NO: 7-8.

20 В другом аспекте указанный LRPXEQHLM представляет собой LRPSEQHLM (SEQ ID NO:137).

В другом аспекте указанный ENNQRXMXEA представляет собой ENNQRSMSEA (SEQ ID NO:138).

В соответствии с данными аспектами и вариантами осуществления настоящего изобретения, указанная композиция содержит по меньшей мере 6 указанных участков Т-клеточных эпитопов.

В дополнительном аспекте указанная композиция содержит по меньшей мере 7 указанных участков Т-клеточных эпитопов.

В дополнительном аспекте указанная композиция содержит каждый из указанных 30 8 участков Т-клеточных эпитопов.

В другом аспекте предусматривается иммуномодулирующая композиция, содержащая каждый из участков Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня, состоящего из:

- (i) FQNLQNHR (SEQ ID NO:1)
- (ii) IVQIEA (SEQ ID NO:2)
- 35 (iii) NEGVIVKVSK (SEQ ID NO:3)
- (iv) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4)
- (v) EGALML (SEQ ID NO:5)
- (vi) IMPAАНP (SEQ ID NO:6)
- (vii) LRPXEQHLM (SEQ ID NO:7)
- 40 (viii) ENNQRXMXEA (SEQ ID NO:8)

или их функциональных производных или гомологов, где указанный остаток X представляет собой цистеин или серин.

В другом аспекте предусматривается иммуномодулирующая композиция, содержащая каждый из участков Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня, состоящего из:

- 45 (i) FQNLQNHR (SEQ ID NO:1)
- (ii) IVQIEA (SEQ ID NO:2)
- (iii) NEGVIVKVSK (SEQ ID NO:3)
- (iv) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4)

- (v) EGALML (SEQ ID NO:5)
- (vi) IMPAAHP (SEQ ID NO:6)
- (vii) LRPSEQHLM (SEQ ID NO:137)
- (viii) ENNQSRMSEA (SEQ ID NO:138)

5 или их функциональных производных или гомологов.

В связанном аспекте настоящее изобретение направлено на иммуномодулирующую композицию, содержащую один или несколько пептидов, причем каждый из этих пептидов имеет длину до 60 смежных аминокислот, и эти пептиды предусматривают каждую из комбинаций участков Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2, детально
10 описанных выше в данном документе.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение направлено на иммуномодулирующую композицию, содержащую один или несколько пептидов, причем каждый из этих пептидов имеет длину до 60 смежных аминокислот, и эти пептиды предусматривают каждый из участков Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня,
15 состоящего из:

- (i) FQNLQNHR (SEQ ID NO:1)
- (ii) IVQIEA (SEQ ID NO:2)
- (iii) NEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:3)
- (iv) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4)
- 20 (v) EGALML (SEQ ID NO:5)
- (vi) IMPAAHP (SEQ ID NO:6)
- (vii) LRPSEQHLM (SEQ ID NO:7)
- (viii) ENNQSRMSEA (SEQ ID NO:8)

или их функциональных производных или гомологов.

25 В другом аспекте указанные пептиды или участки Т-клеточных эпитопов способны модифицировать функцию Т-клеток в случае презентации Т-клеткам, выделенным от субъектов, имеющих состояние, характеризующееся аномальным, нежелательным или по другим причинам неадекватным иммунным ответом на Ara h 1, и/или Ara h 2, или аллерген, присутствующий в композиции, такой как продукт питания, содержащий Ara
30 h 1 и/или Ara h 2, но эти пептиды неспособны связываться с Ara h 1-специфичными и/или Ara h 2-специфичными IgE.

В соответствии с данными аспектами, указанные пептиды выбраны из перечня, состоящего из:

- (i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11)
- 35 (ii) STRSSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:12)
- (iii) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4)
- (iv) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13)
- (v) VFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:14)
- (vi) ANLRPXEQHLM (SEQ ID NO:15)
- 40 (vii) EFENNQRXMXEALQ (SEQ ID NO:16)
- (viii) NNFGKLFEVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:17)
- (ix) GDVFIMPAAHPVAINASSE (SEQ ID NO:18)
- (x) SQLERANLRPXEQHLM (SEQ ID NO:19)
- (xi) ELNEFENNQRXMXEALQ (SEQ ID NO:20)
- 45 (xii) FQNLQNHRIV (SEQ ID NO:21)
- (xiii) RIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:22)
- (xiv) ENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:23)
- (xv) EVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:24)

- (xvi) EFENNQRXMXEALQQI (SEQ ID NO:25)
- (xvii) NNFGKLFVVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:26)
- (xviii) ELNEFENNQRXMXEALQQI (SEQ ID NO:27)
- (xx) WSTRSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:28)
- (xxi) GDVFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:29)

или их функциональных производных или гомологов, где остаток X представляет собой цистеин или серин.

В одном варианте осуществления указанный остаток X представляет собой серин. В дополнительном аспекте указанные пептиды выбраны из:

- (i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11)
- (ii) STRSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:12)
- (iii) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4)
- (iv) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13)
- (v) VFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:14)
- (vi) ANLRPSEQHLM (SEQ ID NO:31)
- (vii) EFENNQRSMSEALQ (SEQ ID NO:32)
- (viii) EVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:24)
- (ix) EFENNQRSMSEALQQI (SEQ ID NO:33)

или их функциональных производных или гомологов.

В другом аспекте указанная иммуномодулирующая композиция содержит каждый из Т-клеточных пептидов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня, состоящего из:

- (i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11);
- (ii) STRSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:12);
- (iii) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:34) и/или EVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:24);
- (iv) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13);
- (v) VFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:14);
- (vi) ANLRPSEQHLM (SEQ ID NO:31); и
- (vii) EFENNQRSMSEALQ (SEQ ID NO:32) и/или EFENNQRSMSEALQQI (SEQ ID NO:33).

или их функциональных производных или гомологов.

В дополнительном аспекте авторы настоящего изобретения создали предпочтительный набор из семи пептидов, пять из которых содержат Т-клеточные эпитопы Ara h 1 и два из которых содержат Т-клеточные эпитопы Ara h 2, которые функционируют особенно эффективно при совместном введении для индукции десенсибилизации или толерантности, и, таким образом, либо профилактического, либо терапевтического лечения гиперчувствительности к композициям, таким как продукты питания, содержащим Ara h 1 и/или Ara h 2. Эти пептиды являются следующими:

- (i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11)
- (ii) STRSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:12)
- (iii) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4) и/или EVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:24),
- (iv) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13)
- (v) VFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:14)
- (vi) ANLRPSEQHLM (SEQ ID NO:31)
- (vii) EFENNQRSMSEALQ (SEQ ID NO:32) и/или EFENNQRSMSEALQQI (SEQ ID NO:33),

В другом аспекте предусматривается иммуномодулирующая композиция, содержащая каждый из Т-клеточных пептидов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня, состоящего из:

- (i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11)
- (ii) STRSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:12)

- (iii) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4) и/или EVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:24),
- (iv) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13)
- (v) VFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:14)
- (vi) ANLRPSEQHLM (SEQ NO:31)

5 (vii) EFENNQRSMSEALQ (SEQ NO:32) и/или EFENNQRSMSEALQQI (SEQ ID NO:33),
В другом аспекте предусматривается композиция, содержащая каждый из Т-

клеточных пептидов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня, состоящего из:

- (i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11)
- (ii) STRSSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:30)
- 10 (iii) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4) и/или EVKPDKKNPQLD (SEQ ID NO:24),
- (iv) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13)
- (v) VFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:14)
- (vi) ANLRPSEQHLM (SEQ NO:31)
- (vii) EFENNQRSMSEALQ (SEQ NO:32) и/или EFENNQRSMSEALQQI (SEQ ID NO:33),
- 15 причем эти пептиды способны уменьшать гиперчувствительность к Ara h 1 и/или Ara h 2 или гиперчувствительность к композиции, содержащей Ara h 1 и/или Ara h 2, при введении субъекту, имеющему состояние, характеризующееся указанной гиперчувствительностью.

Настоящее изобретение направлено на композицию, содержащую пептиды, определенные выше в данном документе. При этом следует понимать, что настоящая композиция может содержать дополнительные компоненты, такие как дополнительные пептиды. Примеры других пептидов, которые могут быть включены в композицию, без ограничения включают:

- (i) ALMLPHFNSKAMVIVVV (SEQ ID NO:34)
- 25 (ii) NNFGKLFEVKPDKKNPQ (SEQ ID NO:35)
- (iii) SQLERANLRPXEQ (SEQ ID NO:36)
- (iv) ELNEFENNQRXM (SEQ ID NO:37)
- (v) NNFGKLFEVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:38)
- (vi) NNFGKLFEVKPDKKNPQL (SEQ ID NO:40)
- 30 (vii) SQLERANLRPXEQH (SEQ ID NO:41)
- (viii) KAMVIVVVNKG TGNLELVAV (SEQ ID NO:42)
- (ix) RELRNLPQQXGLRA (SEQ ID NO:43)
- (x) KAMVIVVVNKG (SEQ ID NO:44)
- (xi) AMVIVVVNKG TGNLELV (SEQ ID NO:45)
- 35 (xii) VVNKG TGNLELVAVRK (SEQ ID NO:46)

или их функциональные производных или гомологи, где остаток X представляет собой цистеин или серин.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает композицию на основе молекулы нуклеиновой кислоты, содержащую одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют Т-клеточные эпитопы и пептиды, определенные выше в данном документе, или их производное, гомолог или аналог, или являются комплементарными последовательности, которая их кодирует.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения и/или профилактики состояния у субъекта, причем это состояние характеризуется аномальным, 45 нежелательным или по другим причинам неадекватным иммунным ответом на Ara h 1, и/или Ara h 2, или аллерген в композиции, содержащей Ara h 1 и/или Ara h 2, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества иммуномодулирующей композиции, определенной выше в данном документе, в течение

периода времени и при условиях, достаточных для устранения или уменьшения присутствия или функционирования у указанного субъекта Т-клеток, направленных против указанного Ara h 1, и/или Ara h 2, или другого аллергена.

В дополнительном аспекте указанное состояние представляет собой

5 гиперчувствительность к разновидностям арахиса или древесным орехам, которые содержат Ara h 1 и Ara h 2 или молекулы, подобные Ara h 1 или подобные Ara h 2, таким как разновидности лещины, разновидности миндаля или разновидности бразильского ореха.

В другом аспекте указанный способ обеспечивает десенсибилизацию или индуцирует 10 иммунологическую толерантность к Ara h 1, и/или Ara h 2, или другому аллергену из указанной композиции.

В другом аспекте указанную десенсибилизацию или толерантность обеспечивают путем индукции анергии или апоптоза Т-клеток.

В другом аспекте указанную десенсибилизацию или толерантность обеспечивают 15 путем индукции Treg клеток, специфичных в отношении Ara h 1 или Ara h 2.

Дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает применение иммуномодулирующей композиции, определенной выше в данном документе, для получения лекарственного препарата для лечения состояния у млекопитающего, причем это состояние характеризуется аномальным, нежелательным или по другим причинам 20 неадекватным иммунным ответом на Ara h 1 и/или Ara h 2.

Предпочтительно указанное состояние представляет собой гиперчувствительность к разновидностям арахиса или древесному ореху, который содержит Ara h 1, и/или Ara h 2, или молекулы, подобные Ara h 1 и/или подобные Ara h 2, такому как лещина.

В другом дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает вакцину, 25 содержащую композицию, определенную выше в данном документе, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями и/или разбавителями. Указанную композицию называют активным ингредиентом.

Другой аспект настоящего изобретения относится к композициям, определенным выше в данном документе, применяемым в способе согласно настоящему изобретению.

30 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигуре 1 представлено графическое изображение скрининга при помощи CFSE в отношении пептид-специфичных Т-клеток из PBMC. (А) CFSE-меченые PBMC от субъекта с аллергией на арахис инкубировали с экстрактом из цельного арахиса или Vax (набором из 7 пептидов). В прямоугольниках показан процент активированных пролиферирующих 35 CD4+ Т-клеток (CD25+CFSElo). SI указывает на кратное увеличение активации Т-клеток по сравнению с контролем без антигена. (В) Подтверждение активации и пролиферации CD4+ Т-клеток из PBMC от донора с аллергией на арахис в ответ на Vax (набор из 7 пептидов) для 7 субъектов (во всех случаях наблюдали положительное значение SI > 2,5).

40 На Фигуре 2 представлено графическое изображение теста активации базофилов (BAT)(А) графики FACS, на которых показано, что кровь от субъекта с аллергией на арахис инкубировали с экстрактом из цельного арахиса или Vax (набор из 7 пептидов). Базофилы идентифицировали как клетки IgEhi (прямоугольник, первый график), и активированные базофилы идентифицировали как CD63hi (прямоугольники, графики 45 2-4). (В) Данные BAT и (С) данные высвобождения гистамина (измеренные при помощи коммерческого набора) для субъекта с аллергией на арахис, полученные после инкубации с возрастающими концентрациями (мкг/мл) экстракта из цельного арахиса или Vax. Положительные контроли представляют собой антитела к IgE и fMLP. Экстракт из

цельного арахиса приводит к высокому уровню активации базофилов и высвобождения гистамина, но Vax не приводит к этому. Представлены данные для 14 протестированных субъектов с аллергией на арахис.

На Фигуре 3 представлено схематическое изображение способа, используемого для идентификации доминантных эпитопов основных аллергенов арахиса Ara h 1 и Ara h 2.

На Фигуре 4 представлено графическое изображение анализа при помощи CFSE продолжительностью 7 дней, разработанного для выявления способности доминантных 20-мерных пептидов индуцировать пролиферацию Т-клеток в цельном образце PBMC от доноров с аллергией на арахис. При помощи чисел в прямоугольниках указан % делящихся (низкое значение CFSE) CD4+ Т-клеток, причем SI = кратное увеличение количества делящихся клеток по сравнению с нестимулированным контролем.

На Фигуре 5 представлено графическое изображение, демонстрирующее частоту ответа линий Т-клеток на 20-мерные пептиды Ara h 1. В прямоугольниках указаны 9 доминантных 20-меров, выбранных в конечном итоге (исходя из множества параметров).

На Фигуре 6 представлено графическое изображение скрининга PBMC с использованием доминантных 20-меров Ara h 1. Тестировали способность доминантных 20-меров целенаправленно воздействовать на специфические CD4+ Т-клетки из PBMC от доноров с аллергией на арахис.

На Фигуре 7 представлено графическое изображение, демонстрирующее частоту ответа линий Т-клеток на 20-мерные пептиды Ara h 2 и количество специфических TCL на 20-мер. В прямоугольниках указаны 4 доминантных 20-мера, выбранные в конечном итоге исходя из множества параметров.

На Фигуре 8 представлено графическое изображение результатов картирования коровых Т-клеточных эпитопов.

На Фигуре 9 представлено графическое изображение HLA-рестрикции доминантных Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2.

На Фигуре 10 представлено графическое изображение распознавания Т-клетками пептидов, в которых выбранные остатки цистеина были замещены остатками серина. Пролиферация TCL в ответ на 'исходные' (содержащие цистеин) пептиды Ara h 2 или таковые с заменой на серин, определенная при помощи поглощения ³H-тимидина. На диаграммах показаны репрезентативные TCL для каждого эпитопа (среднее значение cpm для лунок в повторностях $\pm$ SD). А) Ara h 2 (32-44), В) Ara h 2 (37-47); С) Ara h 2 (91-102); D) Ara h 2 (95-107); E) Ara h 2 (128-141).

На Фигуре 11 представлено графическое изображение продукции цитокинов Т-клетками в ответ на пептиды, в которых выбранные остатки цистеина были замещены остатками серина. Секреция цитокинов в ответ на 'исходные' пептиды Ara h 2 или таковые с заменой цистеина определена при помощи ELISPOT. На диаграммах показаны репрезентативные TCL, специфичные в отношении каждого эпитопа (среднее значение бляшек для лунок в повторностях $\pm$ SD). IL-4, черные столбцы; IL-5, заштрихованные столбцы; IFN- γ , белые столбцы; А) Ara h 2 (32-44), В) Ara h 2 (37-47); С) Ara h 2 (91-102); D) Ara h 2 (95-107); E) Ara h 2 (128-141).

На Фигуре 12 представлено графическое изображение ответов PBMC на объединенные образцы пептидов по сравнению с цельным арахисом. Пептиды, включенные в каждый объединенный образец, показаны в таблице 23. Для критерия знаковых рангов Уилкоксона для связанных выборок показаны р-значения (для непараметрических данных).

На Фигуре 13 представлено графическое изображение ответов PBMC на объединенные

образцы пептидов по сравнению с цельным арахисом. Пептиды, включенные в каждый объединенный образец, показаны в таблице 23. Для критерия знаковых рангов Уилкоксона для связанных выборок показаны р-значения (для непараметрических данных).

5 На Фигуре 14 представлено графическое изображение, на котором представлены Т-клеточные ответы РВМС на объединенный образец 7 предпочтительных пептидов. Статистический анализ: критерий Краскела-Уоллиса для непараметрических данных с апостериорными поправками Данна для тестирования на предмет различий между несколькими группами. *данные, нормализованные в отношении % ответа на цельный арахис по причине вариации величин ответов у различных субъектов в различных когортах, которые анализировали с использованием различных объединенных образцов.

На Фигуре 15 представлено графическое изображение индуцированного пептидом Ara h 2 ингибирования пролиферации Т-клеток.

15 На Фигуре 16 представлено графическое изображение индуцированного пептидом Ara h 1 ингибирования пролиферации Т-клеток.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение отчасти основывается на идентификации группы эпитопов Ara h 1 и Ara h 2, которые, при совместном введении в группе по меньшей мере из пяти, приводят к более эффективным иммунологическим результатам, чем любой из этих эпитопов, применяемый либо отдельно, либо вместе с другими комбинациями этих или других пептидов Ara h 1 или Ara h 2. В частности, было определено, что применение всех восьми эпитопов приводит к особенно и исключительно эффективным функциональным результатам, в особенности, если эти восемь эпитопов вводятся в контексте семи пептидов, приведенных в качестве примера в данном документе.

25 Создание данной композиции обеспечило возможность разработки значительно более эффективных терапевтических и профилактических композиций и подходов к лечению, чем те, которые были доступны к настоящему времени, для лечения состояний, таких как, без ограничения, аллергия на арахис.

Следовательно, один аспект настоящего изобретения направлен на иммуномодулирующую композицию, содержащую по меньшей мере пять участков Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня, состоящего из:

- (i) FQNLQNRH (SEQ ID NO:1)
- (ii) IVQIEA (SEQ ID NO:2)
- (iii) NEGVIVKVS (SEQ ID NO:3)
- 35 (iv) EVKPKDKNPQLQ (SEQ ID NO:4)
- (v) EGALML (SEQ ID NO:5)
- (vi) IMPAHP (SEQ ID NO:6)
- (vii) LRPXEQHLM (SEQ ID NO:7)
- (viii) ENNQRMXEA (SEQ ID NO:8)

40 или их функциональных производных или гомологов, где остаток X представляет собой цистеин или серин, и при этом указанная композиция содержит по меньшей мере один участок Т-клеточного эпитопа, выбранный из SEQ ID NO: 1-6, и по меньшей мере один участок Т-клеточного эпитопа, выбранный из SEQ ID NO: 7-8.

В одном варианте осуществления указанный LRPXEQHLM представляет собой LRPSEQHLM (SEQ ID NO:137).

В другом варианте осуществления указанный ENNQRMXEA представляет собой ENNQRMSEA (SEQ ID NO:138).

В соответствии с данными аспектами и вариантами осуществления настоящего

изобретения, указанная композиция содержит по меньшей мере 6 указанных участков Т-клеточных эпитопов.

В дополнительном варианте осуществления указанная композиция содержит по меньшей мере 7 указанных участков Т-клеточных эпитопов.

5 В дополнительном варианте осуществления указанная композиция содержит каждый из указанных 8 участков Т-клеточных эпитопов.

В соответствии с данным вариантом осуществления, таким образом, предусматривается иммуномодулирующая композиция, содержащая каждый из участков Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня, состоящего из:

- 10 (i) FQNLQNHHR (SEQ ID NO:1)
- (ii) IVQIEA (SEQ ID NO:2)
- (iii) NEGVIVKVSK (SEQ ID NO:3)
- (iv) EVKPKDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4)
- (v) EGALML (SEQ ID NO:5)
- 15 (vi) IMPAAHP (SEQ ID NO:6)
- (vii) LRPSEQHLM (SEQ ID NO:7)
- (viii) ENNQRMXEA (SEQ ID NO:8)

или их функциональных производных или гомологов, где указанный остаток X представляет собой цистеин или серин.

20 В другом варианте осуществления предусматривается иммуномодулирующая композиция, содержащая каждый из участков Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня, состоящего из:

- (i) FQNLQNHHR (SEQ ID NO:1)
- (ii) IVQIEA (SEQ ID NO:2)
- 25 (iii) NEGVIVKVSK (SEQ ID NO:3)
- (iv) EVKPKDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4)
- (v) EGALML (SEQ ID NO:5)
- (vi) IMPAAHP (SEQ ID NO:6)
- (vii) LRPSEQHLM (SEQ ID NO:137)
- 30 (viii) ENNQRMSEA (SEQ ID NO:138)

или их функциональных производных или гомологов.

В связанном аспекте настоящее изобретение направлено на иммуномодулирующую композицию, содержащую один или несколько пептидов, причем каждый из этих пептидов имеет длину до 60 смежных аминокислот, и эти пептиды предусматривают 35 каждую из комбинаций участков Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2, детально описанных выше в данном документе.

В соответствии с данным аспектом, настоящее изобретение направлено на иммуномодулирующую композицию, содержащую один или несколько пептидов, причем каждый из этих пептидов имеет длину до 60 смежных аминокислот, и эти пептиды 40 предусматривают каждый из участков Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня, состоящего из:

- (i) FQNLQNHHR (SEQ ID NO:1)
- (ii) IVQIEA (SEQ ID NO:2)
- (iii) NEGVIVKVSK (SEQ ID NO:3)
- 45 (iv) EVKPKDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4)
- (v) EGALML (SEQ ID NO:5)
- (vi) IMPAAHP (SEQ ID NO:6)
- (vii) LRPSEQHLM (SEQ ID NO:7)

(viii) ENNQSRMSEA (SEQ ID NO:8)

или их функциональных производных или гомологов.

В другом варианте осуществления согласно предыдущим аспектам настоящего изобретения указанные пептиды или участки Т-клеточных эпитопов способны модифицировать функцию Т-клеток в случае презентации Т-клеткам, выделенным от субъектов, имеющих состояние, характеризующееся аномальным, нежелательным или по другим причинам неадекватным иммунным ответом на Ara h 1, и/или Ara h 2, или аллерген, присутствующий в композиции, такой как продукт питания, содержащей Ara h 1 и/или Ara h 2, но эти пептиды неспособны связываться с Ara h 1-специфичными и/или Ara h 2-специфичными IgE.

Без ограничения настоящего изобретения каким-либо образом, разновидности арахиса содержат много белков, при этом количество различных полос, видимых при SDS-PAGE, зависит от применяемой методики. До 53 полос являются видимыми при жидкостной хроматографии высокого давления (de Jong *et al.*, *Clin Exp Allergy* 28: 743-51, 1998). Только два из этих белков обоснованно классифицируются как основные аллергены с применением стандартных критериев, при этом IgE-реактивность наблюдается у более чем 50% популяции с аллергией на арахис; причем эти белки называются Ara h 1 и Ara h 2 (Burks *et al.*, *Allergy* 53: 725-30, 1998). Несмотря на то, что в ряде исследований было показано, что Ara h 2 является более сильным из этих двух аллергенов (Blanc *et al.* *Clin Exp Allergy*. 2009; 39(8):1277-85; Koppelman *et al.* *Clin Exp Allergy*. 2004; 34(4):583-90; Palmer *et al.* *Clin Immunol*. 2005; 115(3):302-12), Ara h 1 также играет основную роль в патогенезе аллергии на арахис, причем в многочисленных исследованиях сообщается о сильных корреляциях тяжести симптомов и IgE-реактивности как в отношении Ara h 1, так и в отношении Ara h 2 (Glaumann *et al.* *Allergy*. 2012; 67(2):242-7; Chiang *et al.* *Pediatr Allergy Immunol*. 2009; 21(2 Pt 2):e429-38; Asarnoj *et al.* *Allergy*. 2010, 65(9):1189-95; Moverare *et al.* *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 156(3):282-90; Lin *et al.* *J Microbiol Immunol Infect.* 2012; Peeters *et al.* *Clin Exp Allergy*. 2007; 37(1):108-15). Ara h 1 является наиболее распространенным основным антигеном арахиса, на него приходится 12-16% от общего белка арахиса (Koppelman *et al.* *Allergy*. 2001; 56(2): 132-7).

Без ограничения настоящего изобретения каким-либо образом, аллерген Ara h 1 представляет собой 7S гликопротеин, накапливающийся в семенах, или вицилин. Концентрация Ara h 1 у разновидностей арахиса возрастает вместе с размером зерна (4-16 мг экстрагированного Ara h 1/г арахиса), так что экспрессия белка ассоциирована со зрелостью арахиса (Pomés *et al.* 2006, *Clin. Exp. Allergy* 36(6):824-30). Ara h 1 представляет собой гомотример, удерживаемый вместе благодаря гидрофобным областям на дистальных концах мономеров, где расположено большинство В-клеточных эпитопов, связывающихся с IgE. Каждый 64,5 кДа мономер содержит мотив *cupin*, который состоит из двух β-бочонков, каждый из которых связан с петлевым доменом α-спиралей.

Ara h 2 представляет собой гликопротеин, который был идентифицирован как представитель семейства конглоутинов, накапливающихся в семенах. 20% молекулярной массы Ara h 2 представляют собой углеводные боковые цепи, и при этом при SDS-PAGE он перемещается в виде дублета со средней молекулярной массой 17,5 кДа (Burks *et al.*, *Int Arch Allergy Immunol* 119:165-172, 1992). Он был охарактеризован как основной аллерген исходя из его реактивности с 6 из 6 протестированных сывороток (Burks *et al.*, 1992, *выше*). Другие данные также подтвердили его важное значение; причем Clarke продемонстрировал, что у 71% субъектов наблюдались специфичные IgE к Ara h 2 при

вестерн-блоттинге с использованием неочищенного экстракта арахиса. Kleber-Janke *et al.* продемонстрировали, что у 85% субъектов при вестерн-блоттинге наблюдались IgE к его рекомбиантной форме, и при этом для группы de Jong было показано, что примерно 78% его группы демонстрировали специфичные IgE к очищенному природному Ara h 2 (Clarke *et al.*, *Clin Exp Allergy* 28: 1251-7, 1998; de Jong *et al.*, 1998, *выше*; Kleber-Janke *et al.*, *Int Arch Allergy Immunol* 119: 265-274, 1999).

Ссылку на “Ara h 1” следует понимать как ссылку на все формы этой молекулы, в том числе ссылку на любые изоформы, которые могут возникнуть в результате альтернативного сплайсинга мРНК Ara h 1, или функциональные мутантные или полиморфные формы Ara h 1. Также ее следует понимать как охватывающую любой белок, кодируемый геном Ara h 1, любую субъединицу полипептида, например, формы-предшественники, которые могут образоваться, независимо от того, существуют ли они в виде мономера, мультимера или белка слияния. Она также предусматривает ссылку на аналоги или эквиваленты Ara h 1, например, которые могут возникать, если продукт, который в естественных условиях содержит Ara h 1, получают синтетическим путем с целью получения продукта, такого как пищевая добавка. Настоящее изобретение, таким образом, предусматривает Т-клеточные эпитопы и способы их применения в диагностике и лечении любого состояния, характеризующегося гиперчувствительностью к молекуле Ara h 1 или молекуле, подобной Ara h 1, такого как аллергия на арахис, или аллергия на древесный орех, или аллергия на антиген, присутствующий в композиции, такой как продукт питания, причем композиция также содержит Ara h 1. Предпочтительно указанный Ara h 1 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO:9, и при этом Ara h 2 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10.

Ссылку на “Т-клетки” следует понимать как ссылку на любую клетку, содержащую Т-клеточный рецептор. При этом Т-клеточный рецептор может содержать любую одну или несколько цепей α , β , γ или δ . Не предполагается ограничение настоящего изобретения конкретным функциональным подклассом Т-клеток, несмотря на то, что в предпочтительном варианте осуществления данная Т-клетка представляет собой Т-хелпер и более предпочтительно клетку Th2-типа и/или Treg клетку. При этом ссылку на “модификацию функции Т-клетки” следует понимать как ссылку на модификацию любой одной или нескольких функций, которые Т-клетка способна выполнять. Например, данная функция может представлять собой пролиферацию, дифференцировку или другую форму функциональной активности клетки, такую как продукция цитокинов. В одном варианте осуществления данная функциональная активность представляет собой пролиферацию.

В контексте “модификации функции” Т-клеток, выделенных от субъектов, имеющих состояние, характеризующееся аномальным, нежелательным или неадекватным иммунным ответом на Ara h 1, и/или Ara h 2, или на композицию, которая содержит Ara h 1 и/или Ara h 2, следует понимать, что это не обязательно является ссылкой на модификацию функции всех Т-клеток в данном биологическом образце, но, вероятно, фактически отражает модификацию функционирования только некоторых из Т-клеток в образце. Например, только часть Т-хелперов в данном образце Т-клеток может давать функциональный ответ на контакт с данным пептидом. Следует понимать, что такой частичный ответ попадает в пределы объема настоящего изобретения. Также следует понимать, что Т-клетки, полученные от субъекта, могут быть свежееотобранными Т-клетками или они могут подвергаться некоторой форме *in vitro* или *in vivo* манипуляции перед тестированием. Например, линии Т-клеток могут быть получены из образца

клеток, и эти линии Т-клеток затем образуют популяцию Т-клеток, полученных от субъекта, тестирование которой осуществляют в соответствии с настоящим изобретением. В тех случаях, когда данная функциональная активность представляет собой пролиферацию Т-клеток, анализ пролиферации Т-клеток предпочтительно осуществляют так, как раскрыто в данном документе. Еще более предпочтительно данная модификация функции Т-клеток представляет собой индукцию пролиферации. При этом ссылку на "Ara h 1-реактивные" или "Arah 2-реактивные" Т-клетки следует понимать как ссылку на Т-клетку, которая дает функциональный ответ на опосредованную HLA презентацию Т-клеточного эпитопа Ara h 1 и/или Ara h 2, соответственно. Аналогично, ссылку на "Ara h 1-специфичные" или "Ara h 2-специфичные" IgE следует понимать как ссылку на IgE, направленные против В-клеточных эпитопов Ara h 1 или Ara h 2, соответственно.

Ссылку на "аномальный, нежелательный или по другим причинам неадекватный" иммунный ответ следует понимать как ссылку на любую форму физиологической активности, которая предусматривает активацию и/или функционирование одной или нескольких иммунных клеток, причем неадекватность этой активности заключается в неадекватном типе или развитии ее неадекватной степени. Он может быть аномальным в том смысле, что, в соответствии с известными принципами иммунологии, он либо не должен возникать тогда, когда он возникает, либо, в ином случае, должен возникать тогда, когда он не возникает. В другом примере, иммунный ответ может быть неадекватным в том смысле, что хотя он и представляет собой физиологически нормальный ответ, он является ненужным и/или нежелательным, например, как в случае реакции гиперчувствительности I типа на безвредные аллергены. В контексте настоящего изобретения этот иммунный ответ может быть направлен против Ara h 1 и/или Ara h 2, или он может быть направлен против другого аллергена, который присутствует в композиции вместе с Ara h 1 и/или Ara h 2. Без ограничения настоящего изобретения какой-либо теорией или механизмом действия, было определено, что даже если реакция гиперчувствительности направлена против аллергена, отличного от Ara h 1 и/или Ara h 2, причем этот аллерген присутствует в композиции, которая все же содержит Ara h 1 и/или Ara h 2, лечение посредством способа согласно настоящему изобретению, направленное против Ara h 1 и/или Ara h 2 все же индуцирует благоприятное модулирование функций Th2 и Treg, так что существующая гиперчувствительность к неродственному аллергену все же уменьшается. Предпочтительно указанным иммунным ответом является гиперчувствительность к арахису.

"Гиперчувствительность к арахису" означает индукцию клинических симптомов опосредованной IgE гиперчувствительности к арахису. Однако следует понимать, что несмотря на то, что клинические симптомы могут быть очевидными, не у всех этих индивидов обязательно будут проявляться выявляемые уровни сывороточного IgE, специфичного к арахису, что измеряют при помощи системы Kallestad Allercoat EAST (Sanofi-Pasteur Diagnostics, США), тем не менее все же следует понимать, что эти индивиды охвачены объемом определения, относящегося к таким, у которых проявляется "гиперчувствительность к арахису". В альтернативном варианте, можно осуществлять тестирование с использованием любой из систем EAST, Pharmacia или UniCap или кожную скарификационную пробу с аллергеном. Ссылку на "гиперчувствительность к Ara h 1 и/или Ara h 2" следует понимать как имеющую соответствующее значение в контексте реактивности в отношении белка Ara h 1 и/или Ara h 2.

В соответствии с предыдущими аспектами, указанные пептиды выбраны из перечня, состоящего из:

- (i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11)
- (ii) STRSSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:12)
- (iii) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4)
- (iv) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13)
- 5 (v) VFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:14)
- (vi) ANLRPSEQHLM (SEQ ID NO:15)
- (vii) EFENNQRXMXEALQ (SEQ ID NO:16)
- (viii) NNFGKLFEVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:17)
- (ix) GDVFIMPAAHPVAINASSE (SEQ ID NO:18)
- 10 (x) SQLERANLRPSEQHLM (SEQ ID NO:19)
- (xi) ELNEFENNQRXMXEALQ (SEQ ID NO:20)
- (xii) FQNLQNHRIV (SEQ ID NO:21)
- (xiii) RIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:22)
- (xiv) ENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:23)
- 15 (xv) EVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:24)
- (xvi) EFENNQRXMXEALQQI (SEQ ID NO:25)
- (xvii) NNFGKLFEVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:26)
- (xviii) ELNEFENNQRXMXEALQQI (SEQ ID NO:27)
- (xx) WSTRSSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:28)
- 20 (xxi) GDVFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:29)

или их функциональных производных или гомологов, где остаток X представляет собой цистеин или серин.

В одном варианте осуществления указанный остаток X представляет собой серин.

Предпочтительно указанные пептиды выбраны из:

- 25 (i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11)
- (ii) STRSSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:12)
- (iii) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4)
- (iv) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13)
- (v) VFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:14)
- 30 (vi) ANLRPSEQHLM (SEQ ID NO:31)
- (vii) EFENNQRSMSEALQ (SEQ ID NO:32)
- (viii) EVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:24)
- (ix) EFENNQRSMSEALQQI (SEQ ID NO:33)

или их функциональных производных или гомологов.

35 В другом варианте осуществления указанная иммуномодулирующая композиция содержит каждый из Т-клеточных пептидов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня, состоящего из:

- (i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11);
- (ii) STRSSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:12);
- (iii) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:34) и/или EVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:24);
- 40 (iv) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13);
- (v) VFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:14);
- (vi) ANLRPSEQHLM (SEQ ID NO:31); и
- (vii) EFENNQRSMSEALQ (SEQ ID NO:32) и/или EFENNQRSMSEALQQI (SEQ ID NO:33).

45 или их функциональных производных или гомологов.

Уменьшение гиперчувствительности к арахису, Ara h 1 и Ara h 2 (и в целом гиперчувствительности к аллергену) более детально обсуждается далее в данном документе. Вкратце, однако, это может принимать форму либо частичной, либо полной

десенсибилизации или толеризации индивида в отношении конкретно Ara h 1 и Ara h 2 или арахиса или других белков в целом.

Ссылка на “пептид” предусматривает ссылку на пептид, полипептид, или белок, или их части. Пептид может быть гликозилированным или негликозилированным и/или
 5 может содержать ряд других молекул, слитых, соединенных, связанных или иным образом ассоциированных с белком, таких как аминокислоты, липиды, углеводы или другие пептиды, полипептиды или белки. Далее в данном документе ссылка на “пептид” предусматривает пептид, содержащий последовательность аминокислот, а также пептид, ассоциированный с другими молекулами, такими как аминокислоты, липиды, углеводы
 10 или другие пептиды, полипептиды или белки.

“Производные” предусматривают фрагменты, части, сегменты и варианты из природных, синтетических или рекомбинантных источников, в том числе белки слияния. Части или фрагменты предусматривают, например, активные участки данного пептида. Производные могут быть получены в результате вставки, делеции или замены
 15 аминокислот. Производные со вставкой аминокислот предусматривают слияния по amino- и/или карбокси-концу, а также вставки одной или нескольких аминокислот внутрь последовательности. К вариантам аминокислотной последовательности со вставкой относятся варианты, в которых один или несколько аминокислотных остатков введены в предварительно определенный участок белка, при этом также возможна
 20 случайная вставка с подходящим скринингом полученного в результате продукта. Варианты с делецией характеризуются удалением одной или нескольких аминокислот из последовательности.

К вариантам с заменой аминокислот относятся варианты, в которых по меньшей мере один остаток в последовательности был удален, а другой остаток вставлен на его
 25 место. Примером вариантов с заменой аминокислот являются консервативные аминокислотные замены. Консервативные аминокислотные замены, как правило, предусматривают замены в пределах следующих групп: глицин и аланин; валин, изолейцин и лейцин; аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; аспарагин и глутамин; серин и треонин; лизин и аргинин; а также фенилаланин и тирозин. Добавления
 30 к аминокислотным последовательностям предусматривают слияния с другими пептидами, полипептидами или белками. В одном варианте осуществления остатки цистеина заменены серином, как приведено в качестве примера в данном документе.

Химические и функциональные эквиваленты данного пептида следует понимать как молекулы, демонстрирующие любую одну или несколько из функциональных
 35 активностей этих молекул, и при этом они могут быть получены из любого источника, например, путем химического синтеза, или идентифицированы посредством способов скрининга, таких как скрининг продуктов природного происхождения.

Гомологи предусматривают пептиды, полученные из разновидностей, отличных от разновидностей арахиса, такие как пептиды, полученные из других древесных орехов.

Аналоги, которые предусматриваются в данном документе, без ограничения
 40 подразумевают модификацию боковых цепей, включение неприродных аминокислот и/или их производных в ходе синтеза пептида, полипептида или белка и применение сшивающих средств и других способов, которые накладывают конформационные ограничения на белковые молекулы или их аналоги. Мутанты предусматривают
 45 молекулы, которые демонстрируют модифицированную функциональную активность (например, пептиды Ara h 1, которые характеризуются одним или несколькими Т-клеточными эпитопами, но характеризуются отсутствием В-клеточной реактивности).

Примеры модификаций боковых цепей, которые предусматриваются согласно

настоящему изобретению, подразумевают модификации аминокрупп, например, путем восстановительного алкилирования посредством реакции с альдегидом с последующим восстановлением NaBH_4 ; амидирование метилацетимидатом; ацилирование уксусным ангидридом; карбамоилирование аминокрупп цианатом; тринитробензилирование аминокрупп 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS); ацилирование аминокрупп янтарным ангидридом и тетрагидрофталевым ангидридом; а также пиридоксирование лизина пиридоксаль-5-фосфатом с последующим восстановлением NaBH_4 .

Гуанидиновая группа остатков аргинина может быть модифицирована посредством образования гетероциклических продуктов конденсации с реактивами, такими как 2,3-бутандион, фенилглиоксаль и глиоксаль. Карбоксильная группа может быть модифицирована путем активации карбодиимидом посредством образования O-ацелизомочевины с последующей дальнейшей дериватизацией, например, с использованием соответствующего амида. Сульфгидрильные группы могут быть модифицированы посредством способов, таких как карбоксиметилирование йодуксусной кислотой или йодацетамидом; окисление цистеиновой кислоты надмуравьиной кислотой; образование смешанных дисульфидов с другими тиоловыми соединениями; реакция с малеимидом, малеиновым ангидридом или другим замещенным малеимидом; образование ртути содержащих производных с использованием 4-хлорортутибензоата, 4-хлорортутифенилсульфоновой кислоты, хлорида фенилртути, 2-хлорортути-4-нитрофенола и других ртути содержащих соединений; карбамоилирование цианатом при щелочном pH. Остатки триптофана могут быть модифицированы путем, например, окисления N-бромсукцинимидом или алкилирования индольного кольца 2-гидрокси-5-нитробензилбромидом или сульфенилгалогенидами. В случае остатков тирозина, они могут быть изменены путем нитрования тетранитрометаном с образованием 3-нитротирозинового производного.

Модификацию имидазольного кольца остатка гистидина можно осуществлять путем алкилирования производными йодуксусной кислоты или N-карбоэтоксилирования диэтилпиокарбонатом.

Примеры включения неприродных аминокислот и производных в ходе синтеза белка без ограничения предусматривают применение норлейцина, 4-аминомасляной кислоты, 4-амино-3-гидрокси-5-фенилпентановой кислоты, 6-аминогексановой кислоты, трет-бутилглицина, норвалина, фенилглицина, орнитина, саркозина, 4-амино-3-гидрокси-6-метилгептановой кислоты, 2-тиенилаланина и/или D-изомеров аминокислот. Перечень неприродных аминокислот, которые предусматриваются в данном документе, представлен в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1

	Нестандартная аминокислота	Код	Нестандартная аминокислота	Код
5	α -аминомасляная кислота	Abu	L-N-метилаланин	Nmala
10	α -амино- α -метилбутират	Mgab	L-N-метиларгинин	Nmarg
	аминоциклопропан- карбоксилат	Cpro	L-N-метиласпарагин	Nmasn
			L-N-метиласпарагиновая кислота	Nmasp
	аминоизомасляная кислота	Aib	L-N-метилцистеин	Nmcys
15	аминонорборнил- карбоксилат	Norb	L-N-метилглутамин	Nmgln
			L-N-метилглутаминовая кислота	Nmglu
	циклогексилаланин	Chexa	L-N-метилгистидин	Nmhis
	циклопентилаланин	Cpen	L-N-метилизолейцин	Nmile
20	D-аланин	Dal	L-N-метиллейцин	Nmleu
	D-аргинин	Darg	L-N-метиллизин	Nmlys
	D-аспарагиновая кислота	Dasp	L-N-метилметионин	Nmmet
	D-цистеин	Dcys	L-N-метилнорлейцин	Nmnle
25	D-глутамин	Dgln	L-N-метилнорвалин	Nmnva
	D-глутаминовая кислота	Dglu	L-N-метилорнитин	Nmorn
	D-гистидин	Dhis	L-N-метилфенилаланин	Nmphe
30	D-изолейцин	Dile	L-N-метилпролин	Nmpro
	D-лейцин	Dleu	L-N-метилсерин	Nmser
	D-лизин	Dlys	L-N-метилтреонин	Nmthr
	D-метионин	Dmet	L-N-метилтриптофан	Nmtrp
35	D-орнитин	Dorn	L-N-метилтирозин	Nmtyr
	D-фенилаланин	Dphe	L-N-метилвалин	Nmval
	D-пролин	Dpro	L-N-метилэтилглицин	Nmetg
	D-serine	Dser	L-N-метил-трет-бутилглицин	Nmtbug
40	D-треонин	Dthr	L-норлейцин	Nle
	D-триптофан	Dtrp	L-норвалин	Nva
	D-тирозин	Dtyr	α -метиламиноизобутират	Maib
45	D-валин	Dval	α -метил- γ -аминобутират	Mgab
	D- α -метилаланин	Dmala	α -метилциклогексилаланин	Mchexa
	D- α -метиларгинин	Dmarg	α -метилциклопентилаланин	Mcpen

	D- α -метиласпарагин	Dmasn	α -метил- α -нафтилаланин	Manap
	D- α -метиласпартат	Dmasp	α -метилпеницилламин	Mpen
5	D- α -метилцистеин	Dmcys	N-(4-аминобутил)глицин	Nglu
	D- α -метилглутамин	Dmgln	N-(2-аминоэтил)глицин	Naeg
	D- α -метилгистидин	Dmhis	N-(3-аминопропил)глицин	Norn
	D- α -метилизолейцин	Dmile	N-амино- α -метилбутират	Nmaabu
10	D- α -метиллейцин	Dmleu	α -нафтилаланин	Anap
	D- α -метиллизин	Dmlys	N-бензилглицин	Nphe
	D- α -метилметионин	Dmmet	N-(2-карбамилэтил)глицин	Ngln
15	D- α -метилорнитин	Dmorn	N-(карбамилметил)глицин	Nasn
	D- α -метилфенилаланин	Dmphe	N-(2-карбоксиэтил)глицин	Nglu
	D- α -метилпролин	Dmpro	N-(карбоксиметил)глицин	Nasp
	D- α -метилсерин	Dmser	N-циклобутилглицин	Ncbut
20	D- α -метилтреонин	Dmthr	N-циклогептилглицин	Nchep
	D- α -метилтриптофан	Dmtrp	N-циклогексилглицин	Nchex
	D- α -метилтирозин	Dmtty	N-циклодецилглицин	Ncdec
25	D- α -метилвалин	Dmval	N-циклододецилглицин	Ncdod
	D-N-метилаланин	Dnmala	N-циклооктилглицин	Ncoct
	D-N-метиларгинин	Dnmarg	N-циклопропилглицин	Ncpro
	D-N-метиласпарагин	Dnmasn	N-циклоундецилглицин	Ncund
30	D-N-метиласпартат	Dnmasp	N-(2,2-дифенилэтил)глицин	Nbhm
	D-N-метилцистеин	Dnmcys	N-(3,3-дифенилпропил)глицин	Nbhe
	D-N-метилглутамин	Dnmgln	N-(3-гуанидинпропил)глицин	Narg
	D-N-метилглутамат	Dnmglu	N-(1-гидроксиэтил)глицин	Nthr
35	D-N-метилгистидин	Dnmhis	N-(гидроксиэтил)глицин	Nser
	D-N-метилизолейцин	Dnmile	N-(имидазолилэтил)глицин	Nhis
	D-N-метиллейцин	Dnmleu	N-(3-индолилэтил)глицин	Nhtrp
	D-N-метиллизин	Dnmlys	N-метил- γ -аминобутират	Nmgabu
40	N-метилциклогексилаланин	Nmchexa	D-N-метилметионин	Dnmmet
	D-N-метилорнитин	Dnmorn	N-метилциклопентилаланин	Nmcpen
	N-метилглицин	Nala	D-N-метилфенилаланин	Dnmphe
45	N-метиламиноизобутират	Nmaib	D-N-метилпролин	Dnmpro
	N-(1-метилпролил)глицин	Nile	D-N-метилсерин	Dnmser
	N-(2-метилпролил)глицин	Nleu	D-N-метилтреонин	Dnmthr

	D-N-метилтриптофан	Dnmtrp	N-(1-метилэтил)глицин	Nval
	D-N-метилтирозин	Dnmtyr	N-метилнафтилаланин	Nmanap
	D-N-метилвалин	Dnmval	N-метилпеницилламин	Nmpen
5	γ-аминомасляная кислота	Gabu	N-(п-гидроксифенил)глицин	Nhtyr
	L-трет-бутилглицин	Tbug	N-(тиометил)глицин	Ncys
	L-этилглицин	Etg	пеницилламин	Pen
10	L-гомофенилаланин	Hphe	L-α-метилаланин	Mala
	L-α-метиларгинин	Marg	L-α-метиласпарагин	Masn
	L-α-метиласпартат	Masp	L-α-метил-трет-бутилглицин	Mtbug
15	L-α-метилцистеин	Mcys	L-метилэтилглицин	Metg
	L-α-метилглутамин	Mgln	L-α-метилглутамат	Mglu
	L-α-метилгистидин	Mhis	L-α-метилгомофенилаланин	Mhphe
	L-α-метилизолейцин	Mile	N-(2-метилтиоэтил)глицин	Nmet
20	L-α-метиллейцин	Mleu	L-α-метиллизин	Mlys
	L-α-метилметионин	Mmet	L-α-метилнорлейцин	Mnle
	L-α-метилнорвалин	Mnva	L-α-метилорнитин	Morn
25	L-α-метилфенилаланин	Mphe	L-α-метилпролин	Mpro
	L-α-метилсерин	Mser	L-α-метилтреонин	Mthr
	L-α-метилтриптофан	Mtrp	L-α-метилтирозин	Mtyr
30	L-α-метилвалин	Mval	L-N-метилгомофенилаланин	Nmhph
	N-(N-(2,2-дифенилэтил)	Nnbhm	N-(N-(3,3-дифенилпролил)	Nnbhe
	карбамилметил)глицин		карбамилметил)глицин	
	1-карбокси-1-(2,2-дифенил-Nmbc		этиламино)циклопропан	

35

Можно использовать сшивающие средства, например, для стабилизации 3D конформаций с применением гомобифункциональных сшивающих средств, таких как бифункциональные сложные имидоэфиры со спейсерными группами (CH₂)_n, причем от n=1 до n=6, глутаральдегид, N-гидроксисукцинимидные сложные эфиры и гетеробифункциональные реактивы, которые обычно содержат фрагмент, способный вступать в реакцию с амином, например, N-гидроксисукцинимид, и фрагмент, способный вступать в реакцию с другой специфической группой.

40

Возможно модифицировать структуру пептида в соответствии с настоящим изобретением для различных целей, например, для повышения растворимости, увеличения терапевтической или профилактической эффективности, увеличения стабильности или повышения устойчивости к протеолитическому распаду. Можно получить модифицированный пептид, в котором была изменена аминокислотная последовательность, например, путем аминокислотной замены, делеции или добавления,

45

для модификации иммуногенности и/или уменьшения аллергенности. Аналогично, к пептидам согласно настоящему изобретению можно добавлять компоненты с получением одного и того же результата.

Например, пептид можно модифицировать так, что он характеризуется способностью индуцировать анергию Т-клеток. В этом случае, остатки, критически важные для связывания с Т-клеточным рецептором, можно определять при помощи известных методик (например, замены каждого остатка и определения наличия или отсутствия Т-клеточной реактивности). В одном примере эти остатки, которые, как показано, являются необходимыми для взаимодействия с Т-клеточным рецептором, можно модифицировать путем замещения необходимой аминокислоты другим, предпочтительно аналогичным аминокислотным остатком (консервативная замена), наличие которого, как показано, изменяет Т-клеточную реактивность или функционирование Т-клеток. Кроме того, эти аминокислотные остатки, которые не являются необходимыми для взаимодействия с Т-клеточным рецептором, можно модифицировать путем замещения другой аминокислотой, включение которой впоследствии может изменять Т-клеточную реактивность или функционирование Т-клеток, но не предотвращает, например, связывание с соответствующими белками МНС. В другом примере можно создать мутантные пептиды, которые характеризуются нормальным связыванием с Т-клетками, но нарушенным связыванием с IgE.

Приведенные в качестве примера консервативные замены детально описаны ниже и включают следующие.

Исходный остаток	Замены, приведенные в качестве примера
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Такие модификации приведут в результате к получению молекул, попадающих в пределы объема выражения “мутанты” данного пептида, как определено в данном документе. Следует понимать, что выражение “мутанты” означает ссылку на пептиды, которые характеризуются одной или несколькими структурными особенностями или функциональными активностями, которые отличаются от тех, которыми характеризуются соответствующие немутированные пептиды.

Пептиды согласно настоящему изобретению также можно модифицировать так, чтобы они включали один или несколько полиморфизмов, возникающих в результате природного аллельного разнообразия, и при этом можно осуществлять замены с

введением D-аминокислот, аминокислот, отличных от природных, или аналогов аминокислот в пептиды с получением модифицированных пептидов, попадающих в пределы объема настоящего изобретения. Пептиды также можно модифицировать посредством конъюгирования с полиэтиленгликолем (PEG) при помощи известных методик. Также можно добавлять репортерные группы для облегчения очистки и потенциального повышения растворимости пептидов в соответствии с настоящим изобретением. Другие хорошо известные типы модификации, предусматривающие вставку сайтов расщепления для специфической эндопротеазы, добавление функциональных групп или замещение гидрофобных остатков менее гидрофобными остатками, а также сайт-направленный мутагенез ДНК, кодирующей пептиды согласно настоящему изобретению также можно применять для введения модификаций, которые могут быть применимыми для широкого спектра целей. Различные модификации пептидов в соответствии с настоящим изобретением, которые были упомянуты выше, упоминаются только в качестве примера и предназначены исключительно для того, чтобы показать широкий спектр модификаций, которые можно осуществлять.

Как детально описано ниже в данном документе, настоящее изобретение предусматривает пептиды, которые сохраняют все или некоторые из их способностей взаимодействовать с Т-клетками, но характеризуются частично или полностью ингибированной, нарушенной или иным образом сниженной реактивностью, опосредованной антителами. Снижения реактивности, опосредованной антителами, можно достичь посредством любого подходящего способа, причем эти способы будут хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, в тех случаях, когда В-клеточный эпитоп определяется его линейной аминокислотной последовательностью, можно добавлять, удалять или заменять один или несколько аминокислотных остатков для ее превращения в мутированную линейную последовательность, которая отличается от последовательности, встречающейся в природе. В тех случаях, когда этот эпитоп может дополнительно или альтернативно определяться как конформационный эпитоп, можно обеспечивать нарушение этой конформации посредством нарушения 2-мерной или, в тех случаях, когда существуют гомодимеры или гетеродимеры, 3-мерной структуры пептида. Это можно осуществлять, например, посредством нарушения образования связей, таких как дисульфидные связи, которые, как известно, стабилизируют 2-мерные и/или 3-мерные структуры. В контексте Т-клеточных эпитопов, определенных выше в данном документе, эти участки Т-клеточных эпитопов не являются В-клеточными эпитопами.

В связанном аспекте авторы настоящего изобретения создали предпочтительный набор из семи пептидов, пять из которых содержат Т-клеточные эпитопы Ara h 1 и два из которых содержат Т-клеточные эпитопы Ara h 2, которые функционируют особенно эффективно при совместном введении для индукции десенсибилизации или толерантности, и, таким образом, либо профилактического, либо терапевтического лечения гиперчувствительности к композициям, таким как продукты питания, содержащим Ara h 1 и/или Ara h 2. Эти пептиды являются следующими:

- (i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11)
- (ii) STRSSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:12)
- (iii) EVKPKDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4) и/или EVKPKDKKNPQLQD (SEQ ID NO:24),
- (iv) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13)
- (v) VFIMPAAHNPVAINASS (SEQ ID NO:14)
- (vi) ANLRPSEQHLM (SEQ NO:31)
- (vii) EFENNQRSMSEALQ (SEQ NO:32) и/или EFENNQRSMSEALQQI (SEQ ID NO:33),

Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления предусматривается иммуномодулирующая композиция, содержащая каждый из Т-клеточных пептидов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня, состоящего из:

(i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11)

(ii) STRSSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:12)

(iii) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4) и/или EVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:24),

(iv) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13)

(v) VFIMPAANHPVAINASS (SEQ ID NO:14)

(vi) ANLRPSEQHLM (SEQ NO:31)

(vii) EFENNQRSMSEALQ (SEQ NO:32) и/или EFENNQRSMSEALQQI (SEQ ID NO:33),

В дополнительном аспекте предусматривается композиция, содержащая каждый из Т-клеточных пептидов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня, состоящего из:

(i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11)

(ii) STRSSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:12)

(iii) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4) и/или EVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:24),

(iv) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13)

(v) VFIMPAANHPVAINASS (SEQ ID NO:14)

(vi) ANLRPSEQHLM (SEQ NO:31)

(vii) EFENNQRSMSEALQ (SEQ NO:32) и/или EFENNQRSMSEALQQI (SEQ ID NO:33),

причем эти пептиды способны уменьшать гиперчувствительность к Ara h 1 и/или Ara h 2 или гиперчувствительность к композиции, содержащей Ara h 1 и/или Ara h 2, при введении субъекту, имеющему состояние, характеризующееся указанной гиперчувствительностью.

Пептиды согласно настоящему изобретению можно получать посредством рекомбинантных способов или способов химического синтеза. В соответствии с предпочтительным аспектом настоящего изобретения предусматривается рекомбинантный пептид или его мутант, который предпочтительно вступает в иммунологическую реакцию с Т-клетками от индивидов с гиперчувствительностью к арахису, причем он экспрессируется посредством экспрессии в клетке-хозяине, трансформированной вектором, кодирующим последовательность пептида согласно настоящему изобретению. Пептид может быть слитым с другим пептидом, полипептидом или белком. В альтернативном варианте, пептид может быть получен посредством методик химического синтеза, например, посредством метода твердофазного синтеза Меррифилда. Более того, несмотря на то, что синтетические пептиды с последовательностью, приведенной выше, представляют собой предпочтительный вариант осуществления, настоящее изобретение также охватывает биологически чистые препараты пептидов, встречающихся в природе, или их фрагментов. “Биологически чистый” означает препарат, содержащий по меньшей мере приблизительно 60%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 70% или предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80% и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% или более при определении по весу, активности или при помощи других подходящих способов.

Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение охватывает пептиды, которые содержат по меньшей мере один коровый участок Т-клеточного эпитопа Ara h 1 и/или Ara h 2, как определено выше в данном документе, в сочетании с другими аминокислотами (которые могут быть или могут не быть встречающимися в природе) или другими химическими веществами. В предпочтительном аспекте настоящего изобретения такие пептиды могут содержать один или несколько эпитопов Ara h 1 и/

или Ara h 2, причем эти эпитопы представляют собой коровые участки Т-клеточных эпитопов. Пептиды с одним или несколькими Т-клеточными эпитопами Ara h 1 и/или Ara h 2 являются необходимыми для улучшенной терапевтической эффективности.

Как детально описано ниже в данном документе, настоящее изобретение направлено на композицию, содержащую пептиды, определенные выше в данном документе. При этом следует понимать, что настоящая композиция может содержать дополнительные компоненты, такие как дополнительные пептиды. Эти пептиды могут охватывать, например, части участков корового минимального эпитопа. В альтернативном варианте, они могут не содержать какую-либо часть Т-клеточного эпитопа, раскрытого в данном документе, но могут быть включены по другим причинам. Примеры других пептидов, которые могут быть включены в композицию, без ограничения включают:

- (i) ALMLPHFNSKAMVIVVV (SEQ ID NO:34)
- (ii) NNFGKLFVVKPDKKNPQ (SEQ ID NO:35)
- (iii) SQLERANLRPXEQ (SEQ ID NO:36)
- (iv) ELNEFENNQRXM (SEQ ID NO:37)
- (v) NNFGKLFVVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:38)
- (vi) NNFGKLFVVKPDKKNPQL (SEQ ID NO:40)
- (vii) SQLERANLRPXEQH (SEQ ID NO:41)
- (viii) KAMVIVVVNKG TGNLELV AV (SEQ ID NO:42)
- (ix) RELRNLPQQXGLRA (SEQ ID NO:43)
- (x) KAMVIVVVNKG (SEQ ID NO:44)
- (xi) AMVIVVVNKG TGNLELV (SEQ ID NO:45)
- (xii) VVNKG TGNLELV AVRK (SEQ ID NO:46)

или их функциональные производных или гомологи, где остаток X представляет собой цистеин или серин.

Также могут быть включены пептиды или молекулы, которые могут быть преимущественными с учетом обстоятельств конкретной ситуации.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает композицию на основе молекулы нуклеиновой кислоты, содержащую одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют Т-клеточные эпитопы и пептиды, определенные выше в данном документе, или их производное, гомолог или аналог, или являются элементарными последовательностями, которая их кодирует.

Следует понимать, что ссылка на “пептиды” предусматривает ссылку на пептиды, содержащие один или несколько Т-клеточных эпитопов. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая данный пептид, предпочтительно представляет собой последовательность дезоксирибонуклеиновых кислот, например, кДНК или геномную последовательность. Геномная последовательность может содержать экзоны и интроны. Геномная последовательность также может содержать промоторный участок или другие регуляторные участки.

Молекула нуклеиновой кислоты может быть лигирована в вектор экспрессии, способный экспрессироваться в прокариотической клетке (например, *E. coli*) или эукариотической клетке (например, клетках дрожжей, клетках грибов, клетках насекомых, клетках млекопитающих или клетках растений). Молекула нуклеиновой кислоты может быть лигирована, или слита, или иным образом ассоциирована с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей другой объект, такой как, например, сигнальный пептид. Она также может содержать дополнительную информацию в виде нуклеотидной последовательности, слитой, соединенной или иным образом ассоциированной с ней либо по 3'-концевой части, либо по 5'-концевой части или по

обеим из 3'- и 5'-концевых частей. Молекула нуклеиновой кислоты также может быть частью вектора, например, вектора экспрессии. Последний вариант осуществления обеспечивает получение рекомбинантных форм данного пептида, причем эти формы охвачены настоящим изобретением.

5 Такие нуклеиновые кислоты могут быть применимыми для рекомбинантного получения Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и/или Ara h 2 или белков, содержащих их, посредством вставки в соответствующий вектор и трансфекции подходящей линии клеток. Такие векторы экспрессии и линии клеток-хозяев также образуют аспект настоящего изобретения.

10 В ходе получения пептидов при помощи рекомбинантных методик клетки-хозяева, трансформированные нуклеиновой кислотой с последовательностью, кодирующей пептид в соответствии с настоящим изобретением, или функциональным эквивалентом последовательности нуклеиновой кислоты, культивируют в среде, подходящей для определенных рассматриваемых клеток. Затем пептиды можно очищать от среды для
15 культивирования клеток, клеток-хозяев или и того, и другого при помощи методик, хорошо известных из уровня техники, таких как ионообменная хроматография, гель-фильтрационная хроматография, ультрафильтрация, электрофорез или иммуноаффинная очистка с использованием антител, специфичных в отношении пептида.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие Ara h 1, и/или Ara h 2, или пептиды, содержащие
20 коровые участки Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и/или Ara h 2, могут экспрессироваться в бактериальных клетках, например, *E. coli*, клетках насекомых, клетках дрожжей или млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (СНО). Подходящие векторы экспрессии, промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии указаны в Sambrook *et al.* (1989). Другие подходящие векторы экспрессии, промоторы,
25 энхансеры и другие элементы, связанные с экспрессией, хорошо известны специалистам в данной области техники. Примеры подходящих векторов экспрессии для дрожжей предусматривают Yер Sec 1 (Balderi *et al.*, 1987, *Embo J.*, 6:229-234); pMFa (Kurjan and Herskowitz., 1982, *Cell.*, 30:933-943); JRY88 (Schultz *et al.*, 1987, *Gene.*, 54:113-123) и pYES2 (Invitrogen Corporation, Сан-Диего, Калифорния). Эти векторы являются
30 общедоступными, так же, как и бакуловирусные системы экспрессии и системы экспрессии для млекопитающих. Например, коммерчески доступной является бакуловирусовая система (ParMingen, Сан-Диего, Калифорния) для экспрессии в клетках насекомых, при этом коммерчески доступным является вектор pMsg (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси) для экспрессии в клетках млекопитающих.

35 Для экспрессии в *E. coli* подходящие векторы экспрессии предусматривают, среди прочих, pTrc (Amann *et al.*, 1998, *Gene.*, 69:301-315), pGex (Amrad Corporation, Мельбурн, Австралия); pMal (N.E. Biolabs, Беверли, Массачуссетс); pRit5 (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси); pEt-11d (Novagen, Мадисон, Висконсин) (Jameel *et al.*, 1990, *J. Virol.*, 64:3963-3966) и pSem (Knapp *et al.*, 1990, *Bio Techniques.*, 8:280-281). Применение pTRC и pEt-11d,
40 например, приведет к экспрессии неслитого белка. Применение pMal, pRit5, pSem и pGex приведет к экспрессии аллергена, слитого с белком, связывающим мальтозу Е (pMal), белком А (pRit5), усеченной галактозидазой (PSEM) или глутатион-S-трансферазой (pGex). Если Т-клеточный эпитоп Ara h 1 или пептид, содержащий его, экспрессируется в виде белка слияния, особенно преимущественным является введение сайта расщепления
45 для фермента по месту слияния между белком-носителем и рассматриваемым пептидом. Пептид согласно настоящему изобретению затем может быть выделен из белка слияния посредством ферментативного расщепления по сайту для фермента и биохимической очистки при помощи традиционных методик для очистки белков и пептидов. Различные

векторы также содержат различные промоторные участки, обеспечивающие конститутивную или индуцируемую экспрессию или индукцию температурой.

Дополнительно, подходящей может быть экспрессия рекомбинантных пептидов в различных хозяевах, относящихся к *E. coli*, которые характеризуются измененной способностью к разложению рекомбинантно экспрессируемых белков. В альтернативном варианте, преимущественным может быть такое изменение последовательности нуклеиновой кислоты, при котором в ней используются кодоны, предпочтительно используемые *E. coli*, при этом такое изменение нуклеиновой кислоты не будет оказывать влияние на аминокислотную последовательность экспрессируемых белков.

Клетки-хозяева можно трансформировать с тем, чтобы они экспрессировали нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению, при помощи традиционных методик, таких как копреципитация фосфатом кальция или хлоридом кальция, DEAE-декстран-опосредованная трансфекция или электропорация. Подходящие способы трансформации клеток-хозяев можно найти в Sambruck *et al.* (1989) и других лабораторных руководствах. Последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению также можно получить путем химического синтеза при помощи стандартных методик.

В дополнение к рекомбинантному получению пептидов в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновые кислоты можно использовать в качестве зондов для экспериментальных целей или целей очистки.

Идентификация и синтез пептидов, раскрытых в данном документе, в настоящее время обеспечивают разработку ряда протоколов профилактического и терапевтического лечения для применения в отношении состояний иммунной системы, связанных с арахисом. Также обеспечивается разработка реактивов для использования в них. Следовательно, следует понимать, что настоящее изобретение охватывает применение пептидов или их функциональных производных, гомологов или аналогов для терапевтического и/или профилактического лечения пациентов. Эти способы лечения без ограничения предусматривают следующее.

(i) Введение данных пептидов пациенту в качестве средств для десенсибилизации или индукции иммунологической толерантности к арахису, Ara h 1, и/или Ara h 2, или молекулам, подобным Ara h 1 и/или подобным Ara h 2. Это можно осуществлять, например, путем индукции анергии или апоптоза Th2, направленных против Ara h 1 и/или Ara h 2. В предпочтительном варианте осуществления такой результат обеспечивают путем применения пептидов, которые поддерживают реактивность в отношении Т-клеточных эпитопов, но которые неспособны связываться с IgE. В альтернативном варианте, можно использовать протоколы лечения, которые основываются на введении специфических концентраций данного пептида в соответствии со специальной схемой для индукции толерантности. При помощи таких методик можно предотвращать гиперчувствительность к Ara h 1 и/или Ara h 2, или они могут уменьшать тяжесть гиперчувствительности к Ara h 1 и/или Ara h 2 или чувствительности к аллергену, присутствующему в композиции, содержащей Ara h 1 и/или Ara h 2, например, аллергии на арахис. В данном документе ссылку на лечение чувствительности к Ara h 1 и/или Ara h 2 следует понимать как охватывающую своим объемом лечение состояний, характеризующихся чувствительностью к композициям, которые содержат Ara h 1 и/или Ara h 2, таким как разновидности арахиса в целом, даже если чувствительность направлена против аллергена, отличного от Ara h 1 и/или Ara h 2.

Предпочтительно такие схемы лечения способны модифицировать Т-клеточный ответ или как В-, так и Т-клеточный ответ рассматриваемого индивида. Как используется

в данном документе, модификация аллергической реакции у индивида, страдающего гиперчувствительностью к арахису, может быть определена как индуцирующая либо отсутствие ответа, либо ослабление симптомов, обусловленных молекулой Ara h 1, как определено при помощи стандартных клинических методик (Varney *et al.* 1991 *British Medical Journal* 302:265-269). Ослабление симптомов предусматривает любое уменьшение аллергической реакции у индивида в отношении Ara h 1 после завершения схемы лечения. Это ослабление может быть субъективным или клинически определенным, например, с применением стандартных пищевых провокационных проб или стандартных кожных проб, известных из уровня техники.

Воздействие пептидов согласно настоящему изобретению на индивида может приводить к толеризации или анергизации соответствующих субпопуляций Т-клеток, так что они утрачивают способность отвечать на Ara h 1 и/или Ara h 2 и не участвуют в стимуляции иммунного ответа при таком воздействии. Предпочтительно пептиды в соответствии с настоящим изобретением сохраняют иммунодоминантные Т-клеточные эпитопы, но будут характеризоваться нарушенным связыванием с IgE. Кроме того, даже если предметом обсуждения не является аллерген Ara h 1 и/или Ara h 2, но оно направлено на другой аллерген, который присутствует в той же композиции, что и Ara h 1 и/или Ara h 2 (например, другой аллерген арахиса), иммунизация при помощи Ara h 1 и/или Ara h 2 все же может индуцировать неспецифический супрессивный эффект, воздействие которого уменьшает степень гиперчувствительности к этому аллергену.

Введение пептида согласно настоящему изобретению может модифицировать профиль секреции цитокинов по сравнению с воздействием встречающегося в природе аллергена Ara h 1 и/или Ara h 2. Это воздействие также может влиять на субпопуляции Т-клеток, которые в норме участвуют в аллергической реакции с тем, чтобы они мигрировали из места или мест, обычно подверженных воздействию аллергена, и в место или места терапевтического введения. Это перераспределение субпопуляций Т-клеток может устранять или уменьшать способность иммунной системы индивида стимулировать обычный иммунный ответ в месте, обычно подверженном воздействию аллергена, что приводит в результате к ослаблению симптомов аллергии.

Модификацию В-клеточного ответа можно осуществлять, например, посредством модулирования профиля цитокинов, продуцируемых Т-клетками, как детально описано выше. В частности, снижение продукции IL-4 и IL-13, происходящих из Т-клеток, таким образом, приводит к снижению синтеза IgE.

(ii) Пептиды согласно настоящему изобретению можно применять в качестве адсорбента для устранения Т-клеток, направленных против Ara h 1 и/или Ara h 2, из биологического образца или у пациента.

Следовательно, в другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения и/или профилактики состояния у субъекта, причем это состояние характеризуется аномальным, нежелательным или по другим причинам неадекватным иммунным ответом на Ara h 1, и/или Ara h 2, или аллерген в композиции, содержащей Ara h 1 и/или Ara h 2, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества иммуномодулирующей композиции, определенной выше в данном документе, в течение периода времени и при условиях, достаточных для устранения или уменьшения присутствия или функционирования у указанного субъекта Т-клеток, направленных против указанного Ara h 1, и/или Ara h 2, или другого аллергена.

Предпочтительно указанное состояние представляет собой гиперчувствительность к разновидностям арахиса или древесным орехам, которые содержат Ara h 1 и Ara h 2 или молекулы, подобные Ara h 1 или подобные Ara h 2, таким как разновидности лещины,

разновидности миндаля или разновидности бразильского ореха.

В одном варианте осуществления указанный способ обеспечивает десенсибилизацию или индуцирует иммунологическую толерантность к Ara h 1, и/или Ara h 2, или другому аллергену из указанной композиции.

5 В другом варианте осуществления указанную десенсибилизацию или толерантность обеспечивают путем индукции анергии или апоптоза Т-клеток.

В другом варианте осуществления указанную десенсибилизацию или толерантность обеспечивают путем индукции Treg клеток, специфичных в отношении Ara h 1 или Ara h 2.

10 “Эффективное количество” означает количество, необходимое, по меньшей мере частично, для того, чтобы достичь необходимого иммунного ответа, или отсрочить манифестацию, или замедлить прогрессирование, или в полной мере воспрепятствовать манифестации или прогрессированию определенного состояния, лечение которого осуществляется. Количество варьирует в зависимости от здоровья и физического
15 состояния индивида, подлежащего лечению, таксономической группы индивида, подлежащего лечению, необходимой степени защиты, состава композиции, оценки медико-санитарной обстановки и других соответствующих факторов. Ожидается, что количество будет попадать в относительно широкий диапазон, который может быть определен посредством обычных методик.

20 Субъектом для лечения или профилактики, как правило, является млекопитающее, такое как без ограничения человек, примат, сельскохозяйственное животное (например, овца, крупный рогатый скот, лошадь, осел, свинья), домашнее животное (например, собака, кошка), лабораторное животное (например, мышь, кролик, крыса, морская свинка, хомячок), содержащееся в неволе дикое животное (например, лисица, олень).

25 Предпочтительно млекопитающим является человек или примат. Наиболее предпочтительно млекопитающим является человек.

В данном документе ссылку на “лечение” и “профилактику” следует рассматривать в ее наиболее широком контексте. Выражение “лечение” не обязательно подразумевает, что субъекта лечат до полного выздоровления. Аналогично, “профилактика” не
30 обязательно означает, что у субъекта не будет развиваться болезненное состояние. Следовательно, лечение и профилактика предусматривают устранение симптомов определенного состояния, или предупреждение, или уменьшение риска развития определенного состояния иным образом. Выражение “профилактика” может рассматриваться как уменьшение тяжести или манифестации определенного состояния.
35 “Лечение” также может уменьшать тяжесть существующего состояния.

Введение композиции согласно настоящему изобретению (в данном документе называемой “средством”) в форме фармацевтической композиции можно осуществлять любым удобным способом. Средство в форме фармацевтической композиции, как
40 предусматривается, демонстрирует терапевтическую активность при введении в количестве, которое зависит от конкретного случая. Эта вариация зависит, например, от человека или животного и выбранного средства. Применимым может быть широкий диапазон доз. В зависимости от пациента, можно вводить, например, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 1 мг средства на дозу. Режим дозирования можно
45 корректировать для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Например, несколько разделенных доз можно вводить раз в день, раз в неделю, раз в месяц или через другие подходящие интервалы времени или, как показано, доза может быть пропорционально уменьшена, как указано в требованиях для конкретной ситуации. В другом примере, указанную композицию изначально вводят для индукции толерантности

и затем, при необходимости, осуществляют бустерные введения композиции для поддержания толерантности. Эти бустерные дозы можно вводить, например, раз в месяц, и при этом их можно вводить в течение любого периода времени, в том числе всей жизни пациента.

5 Средство можно вводить удобным способом, например, пероральным, внутривенным (в случае растворимости в воде), интраперитонеальным, внутримышечным, подкожным, интрадермальным (с использованием или без использования традиционной иглы или
10 другого устройства для трансдермальной доставки), трансдермальным, интраназальным, сублингвальным путем или при помощи суппозитория или имплантации (например, с использованием молекул с медленным высвобождением). Предпочтительно указанную композицию вводят интрадермально. Средство можно вводить в форме фармацевтически приемлемых нетоксичных солей, таких как соли присоединения кислоты или комплексы с металлами, например, с цинком, железом или т. п. (которые считаются солями для
15 целей данной заявки). Такими иллюстративными солями присоединения кислоты являются гидрохлорид, гидробромид, сульфат, фосфат, малеат, ацетат, цитрат, бензоат, сукцинат, малат, аскорбат, тартрат и т. п. Если активный ингредиент подлежит введению в форме таблетки, таблетка может содержать связующее вещество, такое как трагакант, кукурузный крахмал или желатин; вещество для улучшения распадаемости, такое как альгиновая кислота; и скользящее вещество, такое как стеарат магния.

20 В соответствии с данными способами, средство, определенное в соответствии с настоящим изобретением, можно вводить совместно с одним или несколькими другими соединениями или молекулами. “Совместно вводимый” означает одновременное введение в одном и том же составе или в двух различных составах посредством одинаковых или
25 различных путей или последовательное введение посредством одинаковых или различных путей. “Последовательное” введение означает наличие временного интервала в течение секунд, минут, часов или дней между введением двух типов молекул. Эти молекулы можно вводить в любом порядке. Также следует понимать, что пептиды согласно настоящему изобретению сами по себе можно вводить одновременно или
30 последовательно. Их можно вводить в виде одной или нескольких композиций, либо одновременно, либо последовательно. Например, некоторые пептиды можно составлять в одном составе, а другие - в отдельном составе; причем эти два состава в каждой группе считаются одним. В альтернативном варианте можно получать дополнительные отдельные составы и вводить, либо одновременно в разные места, либо последовательно. Специалисту в данной области техники хорошо известно создание и получение
35 продукции в виде соответствующего состава или смеси составов.

Другой аспект настоящего изобретения предусматривает применение иммуномодулирующей композиции, определенной выше в данном документе, для
40 получения лекарственного препарата для лечения состояния у млекопитающего, причем это состояние характеризуется аномальным, нежелательным или по другим причинам неадекватным иммунным ответом на Ara h 1 и/или Ara h 2.

Предпочтительно указанное состояние представляет собой гиперчувствительность к разновидностям арахиса или древесному ореху, который содержит Ara h 1, и/или Ara h 2, или молекулы, подобные Ara h 1 и/или подобные Ara h 2, такому как лещина.

В другом дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает вакцину,
45 содержащую композицию, определенную выше в данном документе, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями и/или разбавителями. Указанную композицию называют активным ингредиентом.

Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают

стерильные водные растворы (в случае растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии, или могут быть в форме крема или другой форме, подходящей для местного применения. Они должны быть стабильными при условиях получения и хранения и должны быть защищены от загрязняющего воздействия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерол, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащую текучесть можно сохранять, например, путем применения вещества для покрытия оболочкой, такого как лецитин, посредством сохранения требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращения воздействия микроорганизмов можно добиться при помощи различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. Вещества для регулирования тоничности применяются для поддержания изотоничности препарата по отношению к плазме крови человека и, таким образом, предотвращают повреждение тканей. Часто используемые вещества, регулирующие тоничность, предусматривают декстрозу, трегалозу, глицерин и маннит. Глицерол и хлорид натрия являются другими вариантами, но они используются не так часто. Во многих случаях предпочтительным будет включение изотонических средств, например, сахаров или хлорида натрия. Пролонгированного поглощения инъекционных композиций можно добиться посредством применения в композициях средств, замедляющих поглощение, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъекционные растворы получают путем включения активных соединений при требуемом количестве в соответствующем растворителе с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости, с последующей стерилизацией путем фильтрации. Как правило, дисперсии получают путем включения различных простерилизованных активных ингредиентов в стерильный наполнитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, предпочтительные способы получения представляют собой вакуумную сушку и методику лиофильной сушки, при помощи которых получают порошок активного ингредиента вместе с любым дополнительным необходимым ингредиентом из его раствора, ранее простерилизованного фильтрацией.

В случае подходящей защиты активных ингредиентов их можно вводить перорально, например, с инертным разбавителем или с усвояемым пищевым носителем, или их можно заключить в желатиновую капсулу с твердой или мягкой оболочкой, или их можно спрессовать в таблетки, или их можно непосредственно включать в продукт питания, входящий в состав рациона. Для перорального терапевтического введения активное соединение может быть включено вместе со вспомогательными веществами и применяться в форме таблеток для проглатывания, буккальных таблеток, пастилок, капсул, настоек, суспензий, сиропов, облаток и т. п. Такие композиции и препараты должны содержать по меньшей мере 1% по весу активного соединения. Процентное содержание в композициях и препаратах, разумеется, может варьировать и, в целях удобства, может составлять от приблизительно 5 до приблизительно 80% веса единицы. Количество активного соединения в таких терапевтически применимых композициях является таким, что будет получена подходящая дозировка. Предпочтительные композиции или препараты в соответствии с настоящим изобретением получают таким

образом, что единичная лекарственная форма для перорального введения содержит от приблизительно 0,1 мкг до 1000 мкг активного соединения.

5 Таблетки, пастилки, пилюли, капсулы и т. п. также могут содержать компоненты, перечисленные далее в данном документе: связующее вещество, такое как камедь, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатин; вспомогательные вещества, такие как вторичный кислый фосфат кальция; вещество для улучшения распадаемости, такое как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота и т. п.; скользящее вещество, такое как стеарат магния; и при этом можно добавлять подсластитель, такой как сахароза, лактоза или сахарин, или ароматизирующее
10 вещество, такое как мята перечная, масло грушанки или вишневый ароматизатор. Если единичная лекарственная форма представляет собой капсулу, она может содержать, в дополнение к материалам вышеуказанного типа, жидкий носитель. Различные другие материалы могут присутствовать в качестве веществ для покрытия оболочкой или могут иным образом модифицировать физическую форму единицы дозирования.
15 Например, таблетки, пилюли или капсулы могут быть покрыты оболочкой с использованием шеллака, сахара или и того, и другого. Сироп или настойка может содержать активное соединение, сахарозу в качестве подсластителя, метил- и пропилапарабены в качестве консервантов, краситель и ароматизатор, такой как вишневая или апельсиновая ароматизирующая добавка. Разумеется, любой материал,
20 используемый для получения любой единичной лекарственной формы, должен быть фармацевтически чистым и фактически нетоксичным в используемых количествах. Кроме того, активное соединение (соединения) может быть включено в препараты и составы с замедленным высвобождением.

Фармацевтическая композиция также может содержать наследственные молекулы, такие как вектор, способный трансфицировать клетки-мишени, где вектор несет молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую модулирующее средство. Вектор может представлять собой, например, вирусный вектор.

Пути введения без ограничения включают респираторный (например, интраназальный или пероральный посредством аэрозоля), интратрахеальный, назофарингеальный,
30 внутривенный, интраперитонеальный, подкожный, интракраниальный, интрадермальный, трансдермальный, внутримышечный, интраокулярный, интратекальный, интрацеребральный, интраназальный, инфузионный, пероральный, ректальный, посредством капельницы для внутривенного вливания, пластыря, имплантата и сублингвальный. Предпочтительно указанный путь введения является
35 подкожным, интрадермальным, трансдермальным или интраназальным.

Другой аспект настоящего изобретения относится к композициям, определенным выше в данном документе, применяемым в способе согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно описывается посредством ссылки на следующие неограничивающие примеры.

40 ПРИМЕР 1

Ara h 1 и Ara h 2 являются наиболее аллергенными и распространенными белками арахиса, что делает пептиды, содержащие их доминантные Т-клеточные эпитопы, необходимыми для включения в терапию. Другим важным соображением при выборе пептидов для иммунотерапии является то, могут ли они презентироваться различными
45 молекулами МНС класса II (молекулами HLA у человека) и, таким образом, быть подходящими для лечения генетически разнообразной человеческой популяции. HLA-рестрикцию презентации пептидов Т-клеткам тестировали при помощи блокирующих антител и HLA-генотипирования, и при этом было показано, что каждый

идентифицированный Т-клеточный эпитоп мог презентироваться на двух или более различных молекулах HLA. Более того, было продемонстрировано, что идентифицированные Т-клеточные эпитопы совместно презентировались на комбинации молекул HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP (таблица 2). Включение HLA-DQ- и -DP-рестриктированных Т-клеточных эпитопов является особенно преимущественным для терапевтического средства, поскольку эти HLA-типы являются более консервативными в смешанных популяциях, чем молекулы HLA-DR, что обеспечивает возможность более широкого охвата популяции с использованием меньшего количества последовательностей Т-клеточных эпитопов.

Смежные или перекрывающиеся Т-клеточные эпитопы объединяли в одиночные пептиды (длиной < 20 аминокислот) для того, чтобы свести к минимуму количество пептидов в конечном терапевтическом наборе, в результате чего получили три кандидатных пептида из Ara h 2 и семь из Ara h 1. Поскольку остатки цистеина могут приводить к проблемам со стабильностью пептида и биологической активностью, остатки цистеина заменяли структурно консервативными, но менее активными остатками серина. Также осуществляли незначительные изменения двух пептидов Ara h 1 для улучшения стабильности и/или растворимости (таблица 2). Во всех случаях было подтверждено, что сохранялась Т-клеточная реактивность в отношении вариантного пептида.

Таблица 2. Терапевтические кандидатные пептиды Ara h 1 и Ara h 2

Последовательность	HLA	Последовательность	HLA
FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV	DR	KAMVIVVVNKG TG NLELVAVDR	DR
*STRSSENNEGVIVKVSKE ¹	DQ	*GDVFIMPAAHPVAINASSE ²	DQ+DR
NNFGKLFVVKPDKKNPQLQ	DR	*SQLERANLRPSEQHLM ³	DP+DQ+DR
VEIKEGALMLPHFNSKA	DQ+DR	*ELNEFENNQRSMSEALQ ³	DR+DQ
ALMLPHFNSKAMVIVVV	DR	*RELRLNPQQSGLRA ³	DR

Пептиды Ara h 1 затенены; пептиды Ara h 2 незатенены. В столбце HLA показаны типы HLA, которые, как известно, презентуют Т-клеточный эпитоп (эпитопы) в пептиде. *Пептиды изменены для улучшения свойств; ¹'W' удалено с N-конца. ²'E' (из нативной последовательности) добавлено к C-концу. ³Жирным показано замещение цистеина серином.

При помощи доклинического скрининга подтверждали Т-клеточную реактивность РВМС в отношении этих пептидов (Фиг. 1), отсутствие активации воспалительных клеток (Фиг. 2) и стабильность в сыворотке крови в дополнительной когорте с аллергией на арахис (n = 40). Было подтверждено распознавание Т-клетками из РВМС одного или нескольких из этих десяти пептидов у 100% субъектов (n = 20), которые участвовали в анализе, причем с 50-90% уровнем ответа на каждый пептид. К настоящему времени анализы явно продемонстрировали, что десять пептидов в таблице 2, приведенной выше, обеспечивают достаточную, практически осуществимую и подходящую смесь.

ПРИМЕР 2

Краткий обзор стадий	
1) Идентификация доминантных Т-клеточных эпитопов основных аллергенов арахиса Ara h 1 и Ara h 2 (Фигуры 3 и 4)	
Выделяли CD4+ Т-клетки, специфичные в отношении Ara h 1 или Ara h 2, из РВМС от субъектов с аллергией на арахис.	
Определяли специфичность Т-клеток в отношении перекрывающихся 20-мерных пептидов, охватывающих полную последовательность Ara h 1 (Фигуры 5 и 6) или 2 (Фигура 7).	
Выбирали доминантные 20-меры и картировали в них последовательности коровых Т-клеточных эпитопов (Фигура 8).	
2) Определение HLA-рестрикции коровых Т-клеточных эпитопов	

5	Блокировали презентацию Т-клеточных эпитопов специфичным Т-клеткам при помощи антител к HLA (Фигура 9).
	HLA-генотипированных субъектов использовали для картирования Т-клеточных эпитопов.
	Дополнительно оценивали вырожденность Т-клеточных эпитопов по связыванию с HLA при помощи алгоритмов.
	3) Создание терапевтических кандидатных пептидов
	Остатки цистеина замещали остатками серина.
10	Объединяли перекрывающиеся Т-клеточные эпитопы в одиночные пептиды длиной ≤ 20 аминокислот (10 пептидов) (таблицы 16-18)
	Создавали более короткие варианты пептидов исходя из одиночных Т-клеточных эпитопов (13 пептидов).
	Синтезировали все 23 пептида с обеспечением $> 95\%$ чистоты, соответствующей GLP, и определяли растворимость в растворах.
	4) Выбор и тестирование конечной терапевтической смеси
	Сравнивали Т-клеточную реактивность PBMC в отношении всех 23 пептидов в когорте с аллергией на арахис и выбирали 7 пептидов для конечного терапевтического средства.
10	Оценивали Т-клеточный ответ PBMC на смесь из 7 пептидов при 2 терапевтических дозах в когорте с аллергией на арахис.
	Тестировали ответ базофилов на смесь из 7 пептидов при 4-log диапазоне дозы в когорте с аллергией на арахис

Материалы и способы

Субъекты. Взрослых субъектов с аллергией на арахис рекрутировали из аллергологической клиники Альфреда (The Alfred Allergy Clinic), Мельбурн, Австралия. У субъектов с аллергией на арахис наблюдались клинические симптомы IgE-опосредованной аллергии на арахис и балл CAP для арахис-специфичных IgE составлял ≥ 2 ($\geq 1,16$ тысяч единиц активности/л; Pharmacia CAP SystemTM, Pharmacia Diagnostics, Уппсала, Швеция), и у многих в анамнезе была анафилаксия. Некоторых субъектов генотипировали (HLA-DRB1, -DQB1 и -DPB1, экзон 2) в Victorian Transplantation and Immunogenetics Service. Исследование было одобрено этическими комитетами университета Монаша и клиники Альфреда, и при этом информированное согласие в письменной форме получали от каждого субъекта.

Антигены. Неочищенный экстракт арахиса (CPE) получали из коммерческих разновидностей несоленого сухого обжаренного арахиса в соответствии с описанием в другом документе (de Leon *et al. Clin Exp Allergy*. 2003;33(9):1273-80), диализовали против фосфатно-солевого буфера (PBS) и стерилизовали посредством фильтрации (0,2 мкм). Природные Ara h 1 и Ara h 2 из CPE обогащали с использованием опубликованных методик (de Jong EC *et al. Clin Exp Allergy*. 1998;28(6):743-51). Вкратце, CPE буферизовали в 20 mM бис-трис-пропане (TBP), pH 7,2, с использованием колонок Vivaspin (Sartorius Stedim Biotech S.A., Обань, Франция) и загружали на 5 мл колонку Mono-Q 10/10 (Pharmacia FPLC System, Сент-Олбанс, Великобритания) уравновешенную TBP. После промывания TBP использовали линейный градиент 30 мл 0-1M NaCl/TBP для элюирования связанных белков (1 мл/мин). Фракции объемом 0,5 мл анализировали при помощи SDS-PAGE, и объединяли те, которые содержали Ara h 1 или Ara h 2 с минимальным количеством других белков, и диализовали против PBS. Содержание эндотоксинов составляло 1,7, 4,0 и 78,0 EU/мг для CPE, Ara h 1 и Ara h 2 соответственно (Endpoint Chromogenic LAL assay, Lonza, Волкерсвилль, США). Пептиды (Mimotopes, Виктория, Австралия, и GenScript USA Inc, Нью-Джерси, США) разводили при 1-4 мг/мл в 10% диметилсульфоксиде/PBS (наборы 20-меров и усеченных пептидов) или PBS, 1-2% уксусной кислоте или 0,1M буферных растворах бикарбоната аммония, как было указано (синтезированные на заказ пептиды коровых эпитопов). Подтверждали, что все антигены не были ни митогенными, ни токсичными в соответствии с описанием (Eusebius NP *et al., Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(3):234-44).

Получение линий CD4⁺ Т-клеток (TCL), специфичных в отношении Ara h 1 и Ara h 2. Олигоклональные TCL, специфичные в отношении Ara h 1 или Ara h 2, получали из моноклеональных клеток периферической крови (PBMC) от субъекта с аллергией на арахис при помощи методики с использованием сукцинимидилового эфира 5,6-

карбоксифлуоресцеиндиацетата (CFSE). (Mannering SI *et al.*, *J Immunol Methods*. 2005;298 (1-2):83-92; Prickett SR, *et al.*, *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):608-15 e1-5). Вкратце, культивирование осуществляли в RPMI-1640, содержащей 2 mM L-глутамин, 100 МЕ/мл пенициллина-стрептомицина и 5% АВ-сыворотки человека (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) (сRPMI). PBMC метили 0,1 мкМ CFSE (Molecular Probes, Юджин, США) и культивировали ($2,5 \times 10^6$ /мл) с сRPMI отдельно, CPE (100 мкг/мл), Ara h 1 или Ara h 2 (10 мкг/мл), объединенными образцами 20-мерных пептидов Ara h 1 или Ara h 2 (10 мкг/мл/пептид) или столбнячным анатоксином в качестве контроля (TT; 10 ЛfU/мл; Statens Serum Institute, Копенгаген, Дания) в течение 7 дней при 37°C. После окрашивания CD4-PE и 7AAD (BD Pharmingen, Сан-Диего, США), клетки CD4+CFSEdim7AAD отсортировывали (10 клеток/лунка) в 96-луночные планшеты с U-образными лунками, содержащими облученные аллогенные фидерные клетки, антитела к CD3 (ОКТ-3), rIL-2 (Cetus, Эмеривиль, США) и фунгизон (Invitrogen, Карлсбад, США), как было описано. Клетки подпитывали rIL-2 при необходимости и через 10-14 дней переносили в 48-луночные планшеты и тестировали в отношении пролиферации в ответ на Ara h 1 или Ara h 2 (10 мкг/мл). Размножали TCL, положительные по Ara h 1 или Ara h 2, с использованием антител к CD3 и rIL-2 в культуральных флаконах T25 (BD, Франклин Лейкс, США) в течение 10-12 дней, затем тестировали в отношении специфичности (пролиферации) в отношении перекрывающихся 20-мерных пептидов, охватывающих соответствующую последовательность (10 мкг/мл). Последовательности коровых эпитопов картировали в пределах выбранных 20-меров при помощи наборов пептидов, усеченных с N- или C-конца 20-мера, как было описано (Prickett SR, *et al.* *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):608-15 e1-5).

Анализы с использованием Т-клеток. Все культивирования осуществляли в RPMI-1640, содержащей 2 mM L-глутамин, 100 МЕ/мл пенициллина-стрептомицина и 5% человеческой сыворотки АВ (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) (сRPMI). Индуцированную антигеном пролиферацию TCL оценивали при помощи следующих анализов с поглощением ³H-тимидина (³H-TdR): анализы осуществляли на 72-часовых культурах в двух повторностях или трех повторностях в 96-луночных планшетах с U-образными лунками, содержащими 1×10^4 Т-клеток/лунка, 1×10^4 облученных (5000 рад) аутологичных EBV-трансформированных PBMC (EBV-В-клеток) в качестве антиген-презентирующих клеток и указанные антигены. В качестве отрицательного контроля использовали сRPMI отдельно. К клеткам в импульсном режиме добавляли ³H-тимидин (³H-TdR; 0,5 мкКи/лунка) в течение последних 16 часов и регистрировали поглощение в виде среднего значения числа импульсов в минуту (срм) для культур в повторностях. Индекс стимуляции (SI; срм для стимулированных антигеном Т-клеток/срм для нестимулированных Т-клеток) $\geq 2,5$ считался положительным, и при этом все положительные ответы были подтверждены в ≥ 2 анализах. Для обеспечения выявления индуцированной пептидом пролиферации CD4+ Т-клеток в цельном образце PBMC получали 7-дневные культуры CFSE-меченых PBMC, как описано для получения TCL, с добавлением антител к CD25 (BD) для оценки активации Т-клеток в дополнение к пролиферации. Анализировали по меньшей мере 10000 CD4+ Т-клеток на образец и рассчитывали SI как процент клеток CD4+CFSElo (пролифериовавших), CD4+CD25+ (активированных) или CD4+CD25+CFSElo (активированных и пролифериовавших) при использовании антигена, деленный на процент для такой же популяции без антигена (фон). Анализ клеток CD4+CD25+CFSElo (активированных и пролифериовавших) обеспечивает наиболее чувствительный способ выявления Т-клеточных ответов с

обозначением $SI \geq 1,5$ как положительного.

Анализы с блокированием HLA класса II: Т-клетки и облученные EBV-В-клетки (1×10^4 каждой) инкубировали с 0,1-10 мкг/мл блокирующего моноклонального антитела (mAb) против HLA-DR (L243, BD Pharmingen), HLA-DQ (SVP-L3), или HLA-DP (B7/21), или антител изотипического контроля (IgG2a: BD Pharmingen; IgG1: BioLegend, Сан-Диего, США) в течение 1 часа при 37°C перед добавлением пептидов (2-10 мкг/мл) или CPE (100 мкг/мл) и тестированием пролиферативного ответа, описанным выше.

Анализы цитокинов при помощи ELISPOT: Планшеты MAIP ELISPOT (Millipore, Биллерика, США) покрывали в течение ночи при 4°C 10 мкг/мл антител к IL-4, IFN-γ или IL-5 (eBioscience, Сан-Диего, США) в PBS. Лунки блокировали (cRPMI, 1 час, 37°C), затем добавляли PBMC ($3,5 \times 10^5$) или Т-клетки и облученные EBV-В-клетки (1×10^4 каждой) в 100 мкл культур в двух повторностях с CPE (100 мкг/мл), nAra h 2 (10 мкг/мл) или пептидами (10 мкг/мл). В качестве контролей использовали cRPMI отдельно, TT (10 IU/мл) и фитогемагглютинин (1 мкг/мл; Sigma-Aldrich). Через 48 часов культивирования при 37°C планшеты инкубировали с биотинилированными антителами к IL-4, IL-5 или IFN-γ (eBioscience) (1 мкг/мл PBS, 2 часа), с последующим добавлением ExtrAvidin®-щелочной фосфатазы (Sigma-Aldrich) (1/3000 PBS, 2 часа) перед проявлением при помощи субстрата для щелочной фосфатазы (Bio-Rad). Когда в лунках положительного контроля появлялись пятна, планшеты промывали, сушили на воздухе и считывали (ридер AID ELISPOT 4.0 h, Autoimmun Diagnostika, Штрассберг, Германия).

Тест активации базофилов: Активацию базофилов оценивали при помощи повышения экспрессии CD63, выявляемого при помощи проточной цитометрии, как описано (Drew AC, et al., *J Immunol.* 2004;173(9):5872-9). Положительные контроли представляли собой антитело кролика к IgE человека (7,5 мкг/мл; DAKO Corporation, Калифорния, США), N-формилметионинлейцинфенилаланин (fMLP) (0,4 мкг/мл; Sigma) и CPE. CPE тестировали в 3 log диапазоне концентрации (50, 5 и 0,5 мкг/мл), и объединенные образцы пептидов тестировали в 4-log диапазоне концентрации (50, 5, 0,5 и 0,05 мкг/мл).

Высвобождение гистамина оценивали при помощи наборов Histamine Release и Histamine ELISA (IBL International GmbH, Гамбург, Германия) согласно инструкциям производителя.

Результаты

Факторы, которые учитывали при выборе доминантных 20-меров, включали:

- частоту ответа,
- количество специфических TCL, полученных на пациента/преобладание специфических Т-клеток в PBMC от пациента;
- величину Т-клеточного ответа,
- паттерны Т-клеточных ответов (комбинации пептидов, распознаваемые у одних и тех же и различных субъектов),
- способность к прямому целенаправленному воздействию пептида на специфические Т-клетки из целой популяции PBMC (скрининг при помощи CFSE),
- однородность Т-клеточных ответов,
- идентификацию корового Т-клеточного эпитопа (эпитопов) в пределах 20-мерного пептида.

Выбор доминантных 20-меров Ara h 1

145 линий Т-клеток, специфичных в отношении Ara h 1 (TCL), получали от 18 доноров с аллергией на арахис, и при этом 65/69 перекрывающихся 20-мерных пептидов, охватывающих Ara h 1, распознавались этими TCL (см. таблицу 3 и Фигуру 5). 14 из этих 65 20-меров выбирали как наиболее часто распознаваемые (4-6 респондеров из 18; 22-33%) (номера пептидов 23, 24, 26, 38, 40, 44-51 и 57). Из этих 14 пептидов выбирали

9 для дополнительного анализа (номера пептидов 23, 24, 40, 46, 47, 49, 50, 51 и 57) (таблица 4).

Этот выбор осуществляли исходя из количества специфических TCL на субъекта, величины ответа с участием TCL, воспроизводимости ответа с участием TCL и способности целенаправленно воздействовать на специфические Т-клетки в РВМС. 9

выбранных 20-меров характеризовались следующим:

- совместно распознавались TCL от 16 из 18 субъектов (89%) в этой когорте;
- как правило, индуцировали сильные и однородные ответы в специфических TCL;
- каждый распознавался несколькими TCL от многих респондеров;

каждый был способным целенаправленно воздействовать на специфические Т-клетки в РВМС от донора (совместно индуцируют выявляемые Т-клеточные ответы РВМС у 18/20 дополнительных субъектов, причем на 20-мер приходилось 8-16 респондеров (40-80%).

Один или несколько из девяти 20-меров распознавались Т-клетками у 35 (92%) из 38 субъектов, причем анализ осуществляли посредством выделения TCL и/или скрининга при помощи CFSE (таблица 3).

Таблица 3

Пролиферативные ответы (поглощение тимидина) TCL на 20-мерные пептиды Ara h 1. В таблице показаны значения SI (= кратное увеличение пролиферации TCL с использованием пептида по сравнению с пролиферацией у нестимулированных TCL). Показаны только индексы стимуляции (SI) $\geq 2,5$. Для субъектов с несколькими TCL, специфичными в отношении данного 20-мера, показано наибольшее значение SI. Темно-серый, SI $\geq 2,5 < 5,0$; SI $\geq 5,0$. В конечном итоге, выбрали 9 доминантных пептидов, показанных в таблице 4.

Таблица 3

		Субъект	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
		№ TCL	1	3	3	3	3	4	4	6	7	7	7	8	10	11	12	14	21	21
5		1	1-20															4,3		3,6
		2	10-29															3,4		
		3	19-38												4,1			3,8		
		4	28-47																	6,3
		5	37-56																	3,7
10		6	46-65												4,3		4,3			4,2
		7	55-74										20			3,3				
		8	64-73			2,8														
		9	73-92										3,5							
		10	82-101										2,8							
15		11	91-110										3,7							
		12	100-119										6,5							
		13	109-128										7,2							
		14	118-137										8,2				2,7			
		15	127-146						3,7				5,0					2,4		
20		16	136-155										14			29				
		17	145-164																	
		18	154-173						11											
		19	163-182				5,3									6,6				
		20	172-191				4,6									11				
25		21	181-200				4,8													
		22	190-209														4,0			16
		23	199-218			142				7,2				15						30
		24	208-227	21	4,7							78		110						
		25	217-236											3,5						
30		26	226-245					2,5	2,9				3,8		2,7			8,6		
		27	235-254					4,6										3,3		
		28	244-263					6,4												5,0
		29	253-272															5,2	26	
		30	262-281													3,4			47	2,8
35		31	271-290						2,6							7,8			43	
		32	280-299					30												
		33	289-308											179					6,3	
		34	298-317											141					3,5	9,0
		35	307-326																2,7	
40		36	316-335				3,9													
		37	325-344				7,3									11		3,3		
		38	334-353								3,4					3,5	3,1		3,2	
		39	342-362													2,5		7,1		
		40	352-371				141							5,0	8,1	58				
45		41	361-380		6,7				21						9,0	29				
		42	370-389										14						46	19
		43	379-398										6,2							4,2
		44	388-407										8,1		19		6,1	3,0		
		45	307-416										16				11	13		3,1
50		46	406-425										10				12	47		2,5
		47	415-434										15				3,6	25		12
		48	424-443										22		2,5			2,7		4,7
		49	433-452										28				15	22		31
		50	442-461					150		5,2	18				136			5,9	4,1	
55		51	451-470					156				43		147		27		5,7	12	
		52	460-479															14		25
		53	469-488													84		49	23	
		54	478-497															27		
		55	487-506															3,8		47
60		56	496-519													31		21		26
		57	505-524					3,3			6,0				11				16	39
		58	514-533														2,5			
		59	523-542											4,8					14	
		60	532-551										6,2							
65		61	541-560										4,0						3,2	17
		62	550-569										19						2,7	
		63	559-578										2,8							7,6
		64	568-587					8,2												4,3
		65	577-596					32							7,8					
70		66	586-605																	
		67	595-614																	
		68	604-623																	
		69	607-626																	25

Таблица 4. Краткое описание выбора доминантных 20-меров Ara h 1

Пептид №	Остатки	Последовательность
23	199-218	FDQRSRQFQNLQNHRIVQIE (SEQ ID NO:47)
24	208-227	NLQNHRIVQIEAKPNTLVLP (SEQ ID NO:48)

40	352-371	RWSTRSSENNEGIVKVSKE (SEQ ID NO:49)
46	406-425	DLSNNFGKLFVKPDKKNPQ (SEQ ID NO:50)
47	415-434	FEVKPDKKNPQLQDLDMMLT (SEQ ID NO:51)
49	433-452	LTCVEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:52)
50	442-461	ALMLPHFNSKAMVIVVVNKG (SEQ ID NO:53)
51	451-470	KAMVIVVVNKG TGNLEIVAV (SEQ ID NO:120)
57	505-524	KEGDVFIMPAANPVAINASS (SEQ ID NO:55)

Скрининг РВМС с использованием доминантных 20-меров *Ara h 1*

В таблице 5 показано, что ≥ 1 доминантного 20-мерного пептида распознавался 18/20 (или 22/24 из всех данных). Каждый 20-мерный пептид распознавался по меньшей мере 7 субъектами. Объединяли данные CFSE и TCL: распознавание подтверждалось у 43/45 субъектов.

Таблица 5

Значения SI индуцированной пептидом пролиферации для 24 субъектов. На верхней панели показана новая когорта доноров с аллергией на арахис (отличная от когорты, используемой для получения TCL). На нижней панели показаны 4 субъекта из когорты, используемой для получения TCL, с объединенными результатами из верхней и нижней панелей.

СРЕ, неочищенный экстракт арахиса; +ve, положительные; nt, не тестировали (исходные растворы пептидов, не доступные на момент тестирования); серый, индексы стимуляции $\geq 1, 1 < 2,5$; черный, индексы стимуляции $\geq 2,5$.

Таблица 5

Субъект	Без антигена*	Индексы стимуляции (SI)										20-меры +ve				
		CPE	20-меры Ara h 1									SI > 1,1		SI > 1,5		
			23	24	40	46	47	49	50	51	57	№	%	№	%	
19	0,22			0,7		nt	nt	nt	0,7			4/6	67	4/6	67	
20	0,08	1,4	1,1	1,4	0,0	nt	nt	nt	1,0	69,3	0,0	3/6	50	1/6	17	
21	0,45	7,0	0,4	2,8	0,5	nt	nt	nt	0,3	1,0	0,4	1/6	17	1/6	17	
22	0,27	54,6	0,4	0,9	0,2	nt	nt	nt	1,7	0,5	0,2	1/6	17	1/6	17	
23	3,02	5,9	0,6	0,8	1,0	nt	nt	nt	1,2	0,4	2,0	2/6	33	1/6	17	
24	0,26	6,8	0,5	0,5	0,6	nt	nt	nt	2,8	2,0	0,7	2/6	33	2/6	33	
25	0,10	152,0	2,2	1,2	0,6	23,4	1,9		0,9	0,4	0,7	5/9	56	4/9	44	
26	0,07	122,8	2,3	5,8	0,9	0,6	1,3		4,2	4,4	2,7	7/9	78	6/9	67	
27	0,17	1,4	0,6	0,8	0,9	1,0	0,7	1,3	0,6	1,1	1,5	3/9	33	1/9	11	
28	0,06	37,5	5,6		6,0	18,0	1,7	2,5	3,0	12,6	29,5	9/9	100	9/9	100	
29	1,87	2,9	1,7	1,7	1,3	0,7	1,1	1,6	1,6	1,7	1,8	8/9	89	6/9	67	
30	0,11	2,1	1,5	2,6	1,7	0,9	0,9	1,2	0,4	2,1	0,5	5/9	56	4/9	44	
31	0,08	10,3	1,9	2,1	1,2	2,5	9,0	1,9	1,5	1,3	2,0	9/9	100	7/9	78	
32	0,06	5,8	0,8	2,4	1,3	1,2	1,6	2,3	10,2	0,9	1,3	7/9	78	4/9	44	
33	1,30	2,3	1,8	0,4	0,8	1,5	1,2	0,9	0,8	0,1	0,2	3/9	33	2/9	22	
34	1,04	1,6^	2,1	1,0	2,8	2,4	2,3	1,5	0,3	2,0	4,1	6/9	66	6/9	66	
35	0,08	8,2^	1,0	0,8	1,3	0,5	3,3	5,3	0,3	0,8	2,0	4/9	44	3/9	33	
36	0,35	6,1^	1,6	1,4	1,6	1,7	4,8	2,6	0,8	1,2	1,5	8/9	89	7/9	78	
37	1,05	7,8	0,3	0,3	0,3	0,6	0,2	0,9	0,7	0,9	0,3	0/9	0	0/9	0	
38	0,78	1,3	0,8	0,9	0,8	0,7	0,9	0,9	0,7	0,7	0,8	0/9	0	0/9	0	
Респондеры w SI > 1,1		#	20/20	11/20	10/20	8/20	7/14	10/14	11/14	8/20	11/20					
		%	100	55	50	40	50	71	79	40	55	55				
		#	17/20	10/20	7/20	4/20	6/14	7/14	9/14	7/20	8/20	10/20				
		%	85	50	35	20	43	50	64	35	40	50				
1	0,17	^	2,4		1,8	1,1	1,7		0,4	0,5	1,2	7/9	78	5/9	56	
2	0,19		1,8	10,3	1,6	1,8	1,0	1,6		1,9		8/9	89	8/9	89	
4	0,62			1,8	4,2	nt	nt	nt				6/6	100	6/6	100	
10	0,23	44,4				nt	nt	nt				6/6	100	6/6	100	
Респондеры w SI > 1,1		#	24/24	15/24	14/24	12/24	9/16	11/16	13/16	11/24	14/24	15/24				
		%	100	63	58	50	56	69	81	46	58	63				
		#	21/24	14/24	11/24	8/24	7/16	8/16	11/16	10/24	11/24	13/24				
		%	88	58	46	33	44	50	69	42	46	54				

Выбор доминантных 20-меров Ara h 2

69 линий Т-клеток, специфичных в отношении Ara h 2 (TCL), получали от 16 доноров с аллергией на арахис, и при этом 16/17 перекрывающихся 20-мерных пептидов, охватывающих Ara h 2, распознавались этими TCL (таблица 6). 4 из этих 16 20-меров выбирали как наиболее часто распознаваемые (каждый с 7-9 респондерами из 16; 44-46%) (номера пептидов 4, 5, 11, 15) (Фигура 7). Этот выбор осуществляли исходя из количества специфических TCL на субъекта, величины ответа с участием TCL, воспроизводимости ответа с участием TCL и способности целенаправленно воздействовать на специфические Т-клетки в РВМС. 4 выбранных 20-мерных пептидов характеризовались следующим:

- совместно распознавались TCL от всех 16 субъектов (100%) в этой когорте;
- как правило, индуцировали сильные и однородные ответы в специфических TCL;
- каждый распознавался несколькими TCL от многих респондеров;
- совместно распознавались ~80% из всех 69 TCL;
- каждый был способным целенаправленно воздействовать на специфические Т-клетки в РВМС от донора (выявляемые Т-клеточные ответы РВМС продемонстрированы у 6 протестированных субъектов).

Один или несколько из четырех 20-меров распознавались Т-клетками у 16/16 (100%) субъектов, причем анализ осуществляли посредством выделения TCL и/или скрининга при помощи CFSE (таблица 6).

Таблица 6

5 Проллиферативные ответы (поглощение тимидина) TCL на 20-мерные пептиды Ara h 2. В таблице показаны значения SI (= кратное увеличение пролиферации TCL с использованием пептида по сравнению с пролиферацией у нестимулированных TCL). Показаны только индексы стимуляции ($\geq 2,5$): серый, $\geq 2,5 \leq 5,0$; черный, $> 5,0$. А) TCL, стимулируемые антигеном; В) TCL, стимулируемые пептидом. Доминантные 20-меры
10 указаны в таблице 7.

15

20

25

30

35

40

45

Таблица 6

20-мерные пептиды Ara h 2																				
			срт для нестимулированных TCL (среднее значение ± SD)	Объединенный образец 1			Объединенный образец 2			Объединенный образец 3			Объединенный образец 4			Объединенный образец 5			Объединенный образец 6	
Субъект	Провоцирующий антиген	TCL		1-20	10-29	19-38	28-47	37-56	46-65	55-74	64-83	73-92	82-101	91-110	100-119	109-128	118-137	127-146	136-155	138-157
A	1	CPE	1	282±6	3,0															
		CPE	2	1031±301		2,8														
		CPE	3	292±110	209,7					3,4										
		CPE	4	131±23									210,5							
		CPE	5	234±18														214,6		
	2	CPE	1	1123±1106						3,1										
		CPE	2	279±86	4,9	11,6	3,9													
	3	CPE	1	99±33		2,5														
		CPE	2	154±62			6,6													
	4	CPE	3	651±59							4,3			3,6						
		Ah2	1	182±4										2,5						
	5	Ah2	1	2257±716										3,3						3,5
		Ah2	1	418±85									40,2	55,3						
	6	Ah2	2	1067±122									2,5	2,5						
		Ah2	3	563±14									6,0	13,5						
		Ah2	4	1202±113													2,7	3,0		
		Ah2	5	895±201													7,0	9,7		
	7	Ah2	1	3071±669					2,6	3,2		2,6		2,5	3,6					
		CPE	1	2245±160											3,4					
	8	CPE	2	2323±281									3,2	3,0	3,3				3,1	
		Ah2	3	747±117									7,4	13,4						
		Ah2	4	969±107										17,3						
		Ah2	5	740±107				16,1	18,7					18,0						
		Ah2	6	4811±1072				5,0												
		Ah2	7	3310±395				7,4												
		Ah2	8	3401±75				6,7												
		Ah2	9	4968±687				8,3	7,2											
		CPE	10	1419±145				9,8	15,5											
		Ah2	11	887±156				21,3	21,3											
		9	CPE	1	951±51				24,6	18,4										
	CPE		2	1042±15				24,8												
	CPE		3	1005±4				46,8												
	CPE		4	474±11															2,7	
	CPE		5	877±283																
	10	Ah2	6	647±243										3,9	28,6	3,5		3,0		
		CPE	1	3795±1863					8,6	6,7										
CPE		2	943±154				19,9													
CPE		3	1630±421				11,9													
CPE		4	871±527	3,6	3,2		25,4	2,8	4,8						3,3				2,6	
CPE		5	1763±630				49			3,1										
CPE		6	1567±188			2,8	3,5						3,0	4,0	3,1			2,7		
11	Ah2	1	5153±1153											4,3						
	Ah2	1	727±176													3,0	12,8			
13	Ah2	1	110±34								18,2					2,9				
	Ah2	2	1113±1				8,7	9,2								2,9		3,3		
	Ah2	3	1019±83															7,1		
	Ah2	4	333±211															9,0		
14	CPE	1	285±32															73,4		
	CPE	2	191±66							2,5								2,5		
15	CPE	1	582±154															3,4	8,6	
	CPE	2	6305±1904																4,1	
	Ah2	3	607±206					2,5											2,5	
	Ah2	4	2215±169			3,6														
16	Ah2	1	4927±367																2,5	
	Ah2	2	1456±21														8,6			
B	7	Объединенный образец 4	2	2257±5										14,9						
		Объединенный образец 3	10	2483±1667							10,7									
	8	Объединенный образец 2	11	2095±384			4,9	7,0												
		Объединенный образец 2	12	1725±235				4,8												
		Объединенный образец 2	13	1297±560				3,3												
		Объединенный образец 4	14	2494±286										6,0						
	9	Объединенный образец 4	15	3038±1236										4,5						
		Объединенный образец 4	16	2868±84									5,4	4,8						
		Объединенный образец 4	6	732±78										16,6						
		Объединенный образец 4	7	1001±30										2,6						
	11	Объединенный образец 2	8	9614±4631			4,3	4,5												
		Объединенный образец 2	2	638±61				33,3	46,6											
12	Объединенный образец 5	2	268±26,4														9,6			
	Объединенный образец 5	3	661±62														16,8			

Таблица 7. Краткое описание выбора доминантных 20-меров Ara h 2

Название	Остатки	Последовательность
20-мер 4	28-47	RRCQSLERANLRPCEQHLM (SEQ ID NO:56)
20-мер 5	37-56	ANLRPCEQHLMQKIQRDEDS (SEQ ID NO:57)

20-мер 11	91-110	ELNEFENNQRCMCEALQQIM (SEQ ID NO:58)
20-мер 15	127-146	KRELRLNPQQCGLRAPQRCD (SEQ ID NO:59)

Картирование коровых Т-клеточных эпитопов

Технический подход

5 TCL от различных субъектов использовали для картирования каждого корового Т-клеточного эпитопа. Точные Т-клеточные эпитопы варьировали у различных TCL и субъектов. Минимальную последовательность, стимулирующую Т-клетки (коровый эпитоп) в пределах каждого выбранного 20-мера определяли путем тестирования пролиферации реактивных TCL от различных субъектов с получением наборов

10 усеченных пептидов (Фигура 8). Количество остатков, требуемых для индукции максимальной пролиферации Т-клеток, варьировало от 6 до 19 аминокислот для различных TCL и/или субъектов (таблицы 8 и 9). По причине вариации количества фланкирующих остатков, требуемых для оптимального распознавания эпитопа, считалось, что TCL распознают один и тот же эпитоп, если пептиды, содержащие общую

15 коровую последовательность, индуцируют распознавание. Исходя из этого критерия, идентифицировали десять различных эпитопов Ara h 1 и 5 различных эпитопов Ara h 2 для CD4⁺ Т-клеток ('консолидированные эпитопы', таблицы 8 и 9) с общими последовательностями 'минимального корового эпитопа', варьирующими от 5 до 12 аминокислот (подчеркнутые последовательности, таблицы 8 и 9). Последовательности

20 'консолидированного эпитопа' представляли собой минимальные последовательности, охватывающие все остатки, требуемые для оптимальной Т-клеточной реактивности, у различных субъектов для обеспечения распознавания, наиболее широкого из возможного.

(i) Коровые Т-клеточные эпитопы, обнаруживаемые в доминантных 20-мерах Ara h

1

Последовательности коровых Т-клеточных эпитопов картировали в пределах доминантных 20-мерных пептидов Ara h 1. Идентифицировали 10 Т-клеточных эпитопов Ara h 1 (консолидированных Т-клеточных эпитопов), в том числе 4 пары перекрывающихся Т-клеточных эпитопов. (Таблица 8)Таблица 8

20-мерный пептид	Минимальная последовательность, требуемая для распознавания Т-клетками		Консолидированный эпитоп (подчеркнутый общий кор)		Подтвержденные респондеры	
	Остатки	Последовательность	Остатки/аминокислоты	Последовательность	TCL	Субъекты
23 (199-218)	(206-213) (206-215)	FQNLQNHR (SEQ ID NO:60) FQNLQNHRIV (SEQ ID NO:61)	(206-215) 10 аминокислот	<u>FQNLQNHR</u> IV	6	3
24 (208-227)	(213-222) (213-225) (214-219)	RIVQIEAKPN (SEQ ID NO:62) RIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:63) IVQIEA (SEQ ID NO:64)	(213-225) 13 аминокислот	<u>RIVQIEAKP</u> NTLV	6	3
40 (352-371) (SEQ ID NO:143) (SEQ ID NO:67)	(353-371) (359-371) (361-370)	WSTRSSENNEGIVKVSKE (SEQ ID NO:65) ENNNEGIVKVSKE NEGIVKVSKE	(353-371) 19 аминокислот	WSTRSSENNEGIVK <u>VSKE</u> *	3	3
46 (406-425) (SEQ ID NO:69) (SEQ ID NO:70)	(409-418) (409-425) (411-418)	NNFGKLFQV (SEQ ID NO:68) NNFGKLFQVDPDKKNPQ FGKLFQV	(409-425) 17 аминокислот	<u>NNFGKLFQV</u> KPDKKNPQ	3	2
47 (415-434)	(416-427)	EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:71)	(416-427) 12 аминокислот	<u>EVKPDKKNPQLQ</u>	2	1
49 (433-452) (SEQ ID NO:73) (SEQ ID NO:74)	(436-445) (436-449) (440-452)	VEIKEGALML (SEQ ID NO:72) VEIKEGALMLPHFN EGALMLPHFNKA	(436-452) 17 аминокислот	<u>VEIKEGALML</u> PHFN KA* (SEQ ID NO:85)	5	2
50 (442-461) (SEQ ID NO:76) (SEQ ID NO:77)	(442-458) (443-457) (446-456)	ALMLPHFNKAMVTVV (SEQ ID NO:75) LMLPHFNKAMVTV PHFNKAMVTV	(442-458) 17 аминокислот	<u>ALMLPHFNKAMV</u> TV*	6	3
(SEQ ID NO:78) (SEQ ID NO:79) (SEQ ID NO:80)	(451-459) (452-461) (455-461)	KAMVTVVNV AMVTVVNVKG IVVNVKG	(451-461) 11 аминокислот	<u>KAMVTVVNV</u> KG (SEQ ID NO:86)	3	2
51 (451-470) (SEQ ID NO:82) (SEQ ID NO:83) (SEQ ID NO:84)	(452-467) (452-468) (457-469) (457-470)	AMVTVVNVKGTGNL (SEQ ID NO:81) AMVTVVNVKGTGNL VVNVKGTGNLVA VVNVKGTGNLVA	(452-470) 19 аминокислот	<u>AMVTVVNVKGTGN</u> <u>LVAV</u> (SEQ ID NO:87)	7	4
57 (505-524) (SEQ ID NO:89) (SEQ ID NO:90) (SEQ ID NO:91) (SEQ ID NO:92)	(507-524) (509-524) (510-521) (511-517) (511-521)	GDVFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:88) VFIMPAAHPVAINASS FIMPAAHPVAIN IMPAAHP IMPAAHPVAIN	(507-524) 18 аминокислот	<u>GDVFIMPAAHPVAIN</u> ASS*	12	4

(ii) Коровые Т-клеточные эпитопы, обнаруживаемые в доминантных 20-мерах Ara h

2

Последовательности коровых Т-клеточных эпитопов картировали в пределах доминантных 20-мерных пептидов Ara h 2. Идентифицировали 5 Т-клеточных эпитопов Ara h 2 ('консолидированных Т-клеточных эпитопов'), в том числе 2 пары перекрывающихся Т-клеточных эпитопов (таблица 9).

Таблица 9

Доминантный 20-мер			Минимальная последовательность, требуемая для распознавания Т-клетками	Консолидированный эпитоп (подчеркнутый общий кор)		Подтвержденные респондеры
Название	Остатки	Последовательность		Последовательность	Остатки	
(SEQ ID NO:93)			(SEQ ID NO:94)			
20-мер 4	28-47	RRCQSOLERANLRPCEQHLM	SQLERANLRPCEQ	SQLERANLRPCEQ	32-44	2 пациента, 5TCL
		(SEQ ID NO:95)	SQLERANLRPC			
		(SEQ ID NO:96)	LERANLRPC			
		(SEQ ID NO:97)	LERANLRPCEQ			
		(SEQ ID NO:98)	ERANLRPCEQ			
		(SEQ ID NO:99)	ANLRPCEQHLM	ANLRPCEQHLM	37-47	4 пациента, 9+TCL
		(SEQ ID NO:100)	LRPCEQHLM			
		(SEQ ID NO:101)	(SEQ ID NO:102)			
20-мер 11	91-110	ELNEFENNQRCMCEALQQIM	ELNEFENNQRCM	ELNEFENNQRCM	91-102	3 пациента, 6TCL
		(SEQ ID NO:103)	LNEFENNQRCM			
		(SEQ ID NO:104)	EFENNQRCMCEALQ	EFENNQRCMCEALQ	94-107	3 пептида, 4TCL
		(SEQ ID NO:105)	ENNQRCMCEA			
		(SEQ ID NO:106)	NNQRCMCEALQ			
		(SEQ ID NO:107)	(SEQ ID NO:108)	(SEQ ID NO:113)		
20-мер 15	127-146	KRELRLNPQQCGLRAPQRC	RELRLNPQQCGL	RELRLNPQQCGLRA	128-141	5 пептидов; 7TCL
		(SEQ ID NO:109)	ELRLNPQQCGLR			
		(SEQ ID NO:110)	ELRLNPQQCGL			
		(SEQ ID NO:111)	LRNLPQQCGL			
		(SEQ ID NO:112)	LRNLPQQCG			

HLA-рестрикция Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2

Распознавание Т-клетками доминантных Т-клеточных эпитопов блокировали моноклональными антителами против HLA-DP, HLA-DQ или HLA-DR (Фигура 9).

Некоторые Т-клеточные эпитопы презентировались как на молекулах HLA-DR, так и на HLA-DQ, тогда как Т-клеточные эпитопы совместно презентировались на HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR (таблица 10).

Таблица 10

Информация о пептиде	Последовательность Т-клеточного эпитопа	Остатки	длина	HLA-рестрикция
Доминантные Т-клеточные эпитопы Ara h 1				
23 коровый	FQNLQNHRIV	206-215	10 аминокислот	HLA-DR
24 коровый	RIVQIEAKPNTLV	213-225	13 аминокислот	HLA-DR
40 коровый	WSTRSSENNEGIVKVSKE	353-371	19 аминокислот	HLA-DQ
46 коровый	NNFGKLFVQPKDKNPQ	409-425	17 аминокислот	HLA-DR
47 коровый	EVPDKKPNQLQ	416-427	12 аминокислот	HLA-DR
коровый 49	VEIKEGALMLPHFNSKA	436-452	17 аминокислот	HLA-DQ
50 коровый	ALMLPHFNSKAMVIVVV	442-458	17 аминокислот	HLA-DR
50/51 коровый	KAMVIVVVNKG	451-461	11 аминокислот	HLA-DR
51 'коровый'	KAMVIVVVNKG TGNLEIVAV	451-470	20 аминокислот	HLA-DR
57 коровый	GDVFIMPAANPVAINASS	507-525	19 аминокислот	HLA-DR или HLA-DQ
Доминантные Т-клеточные эпитопы Ara h 2				
4 коровый	SQLERANLRPCEQ	32-44	13 аминокислот	HLA-DP
4/5 коровый	ANLRPCEQHLM	37-47	11 аминокислот	HLA-DR или HLA-DQ
10 коровый	ELNEFENNQRCM	91-102	12 аминокислот	HLA-DR
10/11 коровый	EFENNQRCMCEALQ	94-107	14 аминокислот	HLA-DQ
15 коровый	RELRLNPQQCGLRA	128-141	14 аминокислот	HLA-DR

HLA-рестрикция презентации Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2

HLA-типирование осуществляли у субъектов с использованием TCL, распознающих доминантные Т-клеточные эпитопы, для оценки подтипов HLA, потенциально способных

презентировать эпитопы Т-клеткам. Отсутствие у субъектов общих аллелей HLA, распознающих Т-клеточные эпитопы с подтвержденной рестрикцией HLA-DR/DQ/DP, указывало на вырожденность Т-клеточных эпитопов по связыванию с HLA. Результаты для Ara h 1 показаны в таблице 11, а результаты для Ara h 2 - в таблице 12.

Таблица 11

При помощи выделения серым указаны Т-клеточные эпитопы, включенные в рассматриваемую смесь 7 пептидов

20-мер	Т-клеточный эпитоп	Субъект	HLA-рестрикция	Соответствующий аллель (аллели) HLA	
23	(206-215)	18	HLA-DR	DRB1 04:05	DRB1 15:01
		3	HLA-DR	DRB1 03:01	DRB1 08:01
24	(213-225)	12	HLA-DR	DRB1 08:01	DRB1 10:01
		10	HLA-DR	DRB1 11:01	DRB1 15:01
40	(353-371)	4	HLA-DQ	DQB1 03:01	DQB1 06:02
		13	HLA-DQ	DQB1 03:01	DQB1 06:02
		14	nt	DQB1 06:09	
46	(409-425)	16	HLA-DR	DRB1 04:04	DRB1 13:01
		15	nt	DRB1 03:01P	DRB1 04:01
47	(416-427)	16	HLA-DR	DRB1 04:04	DRB1 13:01
		15	nt	DRB1 03:01P	DRB1 04:01
49	(436-452)	18	HLA-DQ	DQB1 03:02	DQB1 06:02
			HLA-DR	DRB1 04:05	DRB1 15:01
50	(442-458)	17	HLA-DR	DRB1 11:04	DRB1 15:01
		9	HLA-DR	DRB1 09:01	DRB1 13:01
50+51	(451-461)	12	HLA-DR	DRB1 08:01	DRB1 10:01
		6	HLA-DR	DRB1 04:01	DRB1 04:04
51	(452-470)	10	HLA-DR	DRB1 11:01	DRB1 15:01
		14	nt	DRB1 13:02	
57	(507-524)	17	HLA-DR	DRB1 11:04	DRB1 15:01
		13	HLA-DQ	DQB1 03:01	DQB1 06:02

Nt = HLA-рестрикции не тестировали

HLA-рестрикция презентации эпитопов Ara h 2

Таблица 12

Т-клеточный эпитоп	HLA-генотипирование субъектов с распознаванием каждого Т-клеточного эпитопа						Известная HLA-рестрикция
	DR B1		DQ B1		DP B1		
A: <u>SQLERANLRPCEQ</u>	1201G	1501	0301	0602	0902/1301	0401	DP
	1001	0801	0402	0501	0301G	0401	DP
	0301	0801	0201G	0402	0301G	0401	NT
	0404	0401	0302	0402	0902/1301	0401	NT
B: <u>ANLRPCEQHLM</u>	0901	1301	0303	0603	0301G	0402/0602	DR
	1201G	1501	0301	0602	1301/0902	0401	DR
	0301	1302	0201G	0609	0101	0401	DQ

			1302		0609	0501	0402/0602	DQ
	C: ELNEFENNQRCM	1201G	1501	0301	0602	1301/0902	0401	DR
		1101	1501	0301G	0602		0401	DR
5								
10	D: EFENNQRCMCEALQ	1201G	1501	0301	0602	1301/0902	0401	DQ
		0103	0401	0302	0501	0301G	0201	DQ
		1001	0801	0402	0501	0301G	0401	NT
		0404	0401	0302	0402	0902/1301	0401	NT
			1302		0609	0501	0402/0602	NT
		0701	1501	0201G	0602	0201	0401	NT
		1101	1501	0301G	0602	0301G	0401	NT
15	E: RELRNLPPQCGLRA	1101	1501	0301G	0602		0401	DR
		0405	1501	NA	0602	0301G	0401	DR
		0404	1301	0302	0603	0201	0401	DR
		0901	1301	0303	0603	0301G	0402/0602	NT
			1302		0609	0501	0402/0602	NT
		1101	1501	0301G	0602		0401	NT
		0701	1501	0201G	0602	0201	0401	NT
		0404	0401	0301G	0302	0201	0401	NT

Отсутствие общего аллеля *HLA-DQB1* у всех субъектов, у которых распознавание Т-клеточного эпитопа Ara h 2 (95-107) блокировали при помощи антитела к HLA-DQ, указывало на то, что Т-клеточные эпитопы должны презентироваться несколькими молекулами HLA-DQB1. Аналогично, разнообразие аллелей *HLA-DRB1* у субъектов, у которых распознавание Т-клеточных эпитопов Ara h 2 (127-141) или (37-47) блокировали при помощи антитела к HLA-DR, указывало на вырожденность обоих Т-клеточных эпитопов по связыванию с несколькими молекулами HLA-DRB1.

Кроме презентации по меньшей мере 2 молекулами HLA-DR, Т-клеточный эпитоп Ara h 2 (37-47) также презентировался HLA-DQB1*06:09, поскольку у обоих субъектов, у которых этот Т-клеточный эпитоп распознавался в контексте HLA-DQ, был этот аллель, а у субъекта 9 он был единственным присутствующим аллелем DQB1.

Поскольку аллели *DPB1*04:01* или *DRB1*15:01* присутствовали у всех субъектов, у которых распознавались Т-клеточные эпитопы Ara h 2 (32-44) (блокировали при помощи антитела к HLA-DP) или (95-107) (блокировали при помощи антитела к HLA-DR), соответственно, вырожденность этих Т-клеточных эпитопов не могла быть определена. Однако, поскольку *DPB1*0401* и *DRB1*1501* являются преобладающими в популяциях по всему миру, Т-клеточные эпитопы, которые презентуются этими молекулами HLA, будут распознаваться во многих случаях.

Общие аллели отсутствовали у двух или более субъектов, у которых доминантные консолидированные Т-клеточные эпитопы Ara h 1 распознавались с участием данного типа HLA, что, таким образом, продемонстрировало, что каждый из идентифицированных Т-клеточных эпитопов Ara h 1 также презентировался 2 или более различными молекулами HLA.

Предсказание мотивов, связывающихся с HLA: 20-мерные пептиды Ara h 1

В таблице 13 представлено краткое описание результатов для алгоритма предсказания мотивов, связывающихся с HLA-DR, в доминантных 20-мерах Ara h 1.

(примечание: результаты предсказания не показаны для доминатного '20-мера 5', и фактические эпитопы не перекрываются с '20-мером 4').

Таблица 14

5

Название 20-мера	Последовательность	Остатки
пептид 4 Ara h 2	RRCQSQLERANLRPCEQHLM (SEQ ID NO:122)	28-47
пептид 11 Ara h 2	ELNEFENNQRMCCEALQQIM (SEQ ID NO:123)	91-110
пептид 15 Ara h 2	KRELRLNPQQCGLRAPQRCD (SEQ ID NO:124)	127-146

Таблица 15

10 При помощи выделения указаны особенно часто встречающиеся аллели в популяциях европеоидов.

(SEQ ID NO:126)

(SEQ ID NO:130)

15 (SEQ ID NO:128)

(SEQ ID NO:127)

20 (SEQ ID NO:129)

(SEQ ID NO:125)

25

30

35

40

45

Аллели HLA-DRB	Частота у европейцев в США	Мультипрогноз: скрытая модель Маркова; >7			Прогноз при помощи Propred: Sturniolo; свыше 3%		
		пептид 4 Ara h 2	пептид 11 Ara h 2	пептид 15 Ara h 2	пептид 4 Ara h 2	пептид 11 Ara h 2	пептид 15 Ara h 2
DRB1_0101:	9,1	LERANLRPC LRPCEQHLM	FENNQRMC LNEFENNQR	LRNLPQQCG LPQQCGLRA			LRNLPQQCG
DRB1_0102:	1,4				LRPCEQHLM		LRNLPQQCG
DRB1_0301:	13,1	LERANLRPC LRPCEQHLM	FENNQRMC LNEFENNQR	LRNLPQQCG LPQQCGLRA			
DRB1_0305:						FENNQRMC	
DRB1_0306:							
DRB1_0307:							
DRB1_0308:							
DRB1_0309:							
DRB1_0311:							
DRB1_0401:	5,4	LERANLRPC LRPCEQHLM	FENNQRMC LNEFENNQR	LRNLPQQCG LPQQCGLRA			
DRB1_0402:	1						
DRB1_0404:	3,9						
DRB1_0405:	0,3						
DRB1_0408:							
DRB1_0410:							
DRB1_0421:							
DRB1_0423:							
DRB1_0426:							
DRB1_0701:	14,8	LERANLRPC LRPCEQHLM	FENNQRMC LNEFENNQR	LRNLPQQCG LPQQCGLRA			
DRB1_0703:							
DRB1_0801:	2,2	LERANLRPC LRPCEQHLM	FENNQRMC LNEFENNQR	LRNLPQQCG LPQQCGLRA			
DRB1_0802:						FENNQRMC	
DRB1_0804:							
DRB1_0806:							
DRB1_0813:							
DRB1_0817:							
DRB1_1101:	5,6	LERANLRPC LRPCEQHLM	FENNQRMC LNEFENNQR	LRNLPQQCG LPQQCGLRA		FENNQRMC	
DRB1_1102:					LERANLRPC LRPCEQHLM		
DRB1_1104:	2,7						
DRB1_1106:							
DRB1_1107:							
DRB1_1114:						FENNQRMC	
DRB1_1120:					LRPCEQHLM		
DRB1_1121:					LERANLRPC		
DRB1_1128:					LRPCEQHLM		
DRB1_1301:	5,6	LERANLRPC LRPCEQHLM	FENNQRMC LNEFENNQR	LRNLPQQCG LPQQCGLRA	LRPCEQHLM		LRNLPQQCG
DRB1_1302:	0,7				LRPCEQHLM		
DRB1_1304:					LRPCEQHLM		LRNLPQQCG
DRB1_1305:							
DRB1_1307:						FENNQRMC	
DRB1_1311:							
DRB1_1321:							
DRB1_1322:					LERANLRPC LRPCEQHLM		
DRB1_1323:						FENNQRMC	
DRB1_1327:					LRPCEQHLM		LRNLPQQCG
DRB1_1328:					LRPCEQHLM		LRNLPQQCG
DRB1_1501:	14,2	LERANLRPC LRPCEQHLM	FENNQRMC LNEFENNQR	LRNLPQQCG LPQQCGLRA			
DRB1_1502:	0,7						
DRB1_1506:							
DRB5_0101:							
DRB5_0105:							

Улучшение пептидов для терапевтической доставки

Потенциально проблематичные остатки цистеина были замещены структурно консервативными, но менее химически активными остатками серина. Подтверждали, что Т-клеточная реактивность была сохранена (Фигуры 10 и 11). Содержащие серин пептиды на основе Т-клеточных эпитопов характеризовались Т-клеточными ответами, сравнимыми с нативными пептидами, содержащими цистеин.

Объединение перекрывающихся Т-клеточных эпитопов Ara h 1 в одиночные пептиды длиной ≤20 аминокислот

Таблица 16

20-мерный пептид	Минимальная последовательность, требуемая для распознавания Т-клетками		Консолидированный эпитоп (подчеркнутый общий кор)		Подтвержденные респондеры	
	Остатки	Последовательность	Остатки/аминокислоты	Последовательность	TCL	Субъекты
23 (199-218)	(206-213)	FQNLQNHR	(206-215)	FQNLQNHRIV	6	3
24 (208-227)	(206-215) (213-222) (213-225) (214-219)	FQNLQNHRIV RIVQIEAKPN RIVQIEAKPNTLV IVQIEA	10 аминокислот (213-225) 13 аминокислот	RIVQIEAKPNTLV	6	3
Объединенные перекрывающиеся эпитопы			(206-225) 20 аминокислот	FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV*	12	6
40 (352-371)	(353-371) (359-371) (361-370)	WSTRSENNEGIVKVSKE ENNEGIVKVSKE NEGIVKVSKE	(353-371) 19 аминокислот	WSTRSENNEGIVKVSKE*	3	3
46 (406-425)	(409-418) (409-425) (411-418)	NNFGKLFEVK NNFGKLFEVKPDKKNPQ FGKLFEVK	(409-425) 17 аминокислот	NNFGKLFEVKPDKKNPQ	3	2
47 (415-434)	(416-427)	EVKPDKKNPQLQ	(416-427) 12 аминокислот	EVKPDKKNPQLQ	2	1
Объединенные перекрывающиеся эпитопы			(409-427) 19 аминокислот	NNFGKLFEVKPDKKNPQLQ*	3	2
49 (433-452)	(436-445) (436-449) (440-452)	VEIKEGALML VEIKEGALMLPHFN EGALMLPHFNSKA	(436-452) 17 аминокислот	VEIKEGALMLPHFNSKA*	5	2
50 (442-461)	(442-458) (443-457) (446-456)	ALMLPHFNSKAMVTVV LMLPHFNSKAMVTV PHFNSKAMVTV	(442-458) 17 аминокислот	ALMLPHFNSKAMVTVV*	6	3
	(451-459) (452-461) (455-461)	KAMVTVVNVN AMVTVVNVNKG IVVNVNKG	(451-461) 11 аминокислот	KAMVTVVNVNKG	3	2
51 (451-470)	(452-467) (452-468) (457-469) (457-470)	AMVTVVNVNKG TGNLEL AMVTVVNVNKG TGNLELV VVNKG TGNLELVA VVNKG TGNLELVAV	(452-470) 19 аминокислот	AMVTVVNVNKG TGNLELVAV	7	4
Объединенные перекрывающиеся эпитопы			(451-470) 20 аминокислот	KAMVTVVNVNKG TGNLELVAV*	10	6
57 (505-524)	(507-524) (509-524) (510-521) (511-517) (511-521)	GDVFIMPAAHPVAINASS VFIMPAAHPVAINASS FIMPAAHPVAIN IMPAAHP IMPAAHPVAIN	(507-524) 18 аминокислот	GDVFIMPAAHPVAINASS*	12	4

При помощи выделения серым указаны пары перекрывающихся консолидированных Т-клеточных эпитопов, объединенные в одиночные пептиды для дополнительного анализа, изложенного в тексте. * При помощи звездочек и прямоугольников указаны семь кандидатных пептидов Ara h 1, предложенных для применения в терапевтическом средстве.

Объединение перекрывающихся Т-клеточных эпитопов Ara h 2 в одиночные пептиды длиной ≤20 аминокислот

Таблица 17

Доминантные 20-меры		Коровые эпитопы		Кандидатные пептиды	
Остатки	Последовательность	Остатки	Последовательность	Остатки	Последовательность
28-47	RRCQSQLERANLRPCEQHLM	32-44	(SEQ ID NO:94) SQLERANLRPCEQ	32-47 C42S	(SEQ ID NO:141) SQLERANLRPSEQHLM
		37-47	ANLRPCEQHLM		
82-101	SQHQRCCNELNEFENNQR	91-102	ELNEFENNQR	91-107 C[101+103]S	(SEQ ID NO:142) ELNEFENNQRSMSEALQ
91-110	ELNEFENNQR	95-107	(SEQ ID NO:140) EFENNQR		
127-146	KRELRNLPQQCGLRAPQRCD	128-141	RELRNLPQQCGLRA	128-141 C137S	RELRNLPQQSGLRA

Обобщенные кандидатные пептиды Ara h 1 и Ara h 2

Всего было 10 кандидатных пептидов: 7 из Ara h 1 и 3 из Ara h 2 (таблица 18).

Таблица 18

Информация о пептиде	Последовательность	Остатки	длина	HLA-рестрикция
Доминантные Т-клеточные эпитопы Ara h 1				
23+24 коровый	FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV	206-225	20 аминокислот	HLA-DR
40 коровый	WSTRSSENNEGVIVKVSKE	353-371	19 аминокислот	HLA-DQ
46+47 коровый	NNFGKLFVVKPDKKNPQLQ	409-427	19 аминокислот	HLA-DR
коровый 49	VEIKEGALMLPHFNSKA	436-452	17 аминокислот	HLA-DQ
50 коровый	ALMLPHFNSKAMVIVVV	442-458	17 аминокислот	HLA-DR
51 'коровый'	KAMVIVVVNKG TGNLELVAV	451-470	20 аминокислот	HLA-DR
57 коровый	GDVFIMPAANHPVAINASS	507-525	19 аминокислот	HLA-DR или HLA-DQ
Доминантные Т-клеточные эпитопы Ara h 2				
4+4/5 коровый	SQLERANLRPSEQHLM	32-47 C42S	16 аминокислот	HLA-DP, -DQ или DP
10+10/11 коровый	ELNEFENNQRSMSEALQ	91-107 C[101+103]S	17 аминокислот	HLA-DR или -DQ
15 коровый	RELRNLPQQSGLRA	128-141	14 аминокислот	HLA-DR

Также создавали 13 дополнительных более коротких вариантов пептидов (исходя из одиночных Т-клеточных эпитопов) для сравнения. Некоторые последовательности были удлинены или укорочены (наряду с нативными последовательностями и остатками, критически важными для распознавания Т-клетками) для улучшения свойств пептидов, связанных с получением и растворимостью. Это приводило в результате к панели из 23 кандидатных пептидов для сравнения. Подробности относительно пептидов обобщены в таблице 19.

Все из пептидов в таблице 18 получали с 95-99,9% чистотой, и определяли растворимость в растворах. Затем сравнивали Т-клеточные ответы на каждый из этих пептидов при 2 дозах с использованием РВМС от 25 субъектов с аллергией на арахис для выбора конечной терапевтической комбинации.

Таблица 19

№ пептида /Информация	Последовательность	Остатки	Длина	Буфер (4 мг/мл)	№ пептида /Информация	Последовательность	Остатки	Длина	Буфер (4 мг/мл)		
10 основных кандидатных пептидов											
Пептиды Ага h 1					13 более коротких вариантных пептидов						
1	коровый 23+24	FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV	206-225	20 аминокислот	2% уксусная кислота/H2O	11	23 коровый	FQNLQNHRIV	206-215	10 аминокислот	PBS
						12	24 коровый	RIVQIEAKPNTLV	213-225	13 аминокислот	PBS
2	коровый 40	STRSENNEGVV/KVSKE	354-371	18 аминокислот	PBS	13	40 короткий коровый	ENNEGVV/KVSKE	359-371	13 аминокислот	PBS
3	коровый 46+47	NNFGKLFEEV/KPDKKPRQLQ	409-427	19 аминокислот	PBS	14	46 коровый	NNFGKLFEEV/KPDKKPRQ	409-425	17 аминокислот	PBS
							47 коровый	EVKPRDKKPRQLQ	416-427	12 аминокислот	PBS
4	коровый 49	VEKEGALMLPHNSKA	436-452	17 аминокислот	PBS						
5	коровый 50	ALMLPHNSKAMVVVV	442-458	17 аминокислот	1% уксусная кислота/PBS	16	50/51 коровый	KAMVVVV/NKG (SEQ ID NO:131)	451-461	11 аминокислот	10% уксусная кислота
6	коровый 51	KAMVVVV/NKGTGNLELVAV	451-470	20 аминокислот	10% уксусная кислота/H2O	17	51 'коровый а'	AMVVVV/NKGTGNLELV	452-468	17 аминокислот	10% уксусная кислота
						18	51 'коровый б'	VV/NKGTGNLELVAVRK (SEQ ID NO:132)	457-470	14 аминокислот	PBS
7	коровый 57 (дополнительный E)	GDVFI MP AANPVAINASSE	507-525	19 аминокислот	0.1M NH4HCO3	19	57 короткий коровый	VFI MP AANPVAINASS	509-524	16 аминокислот	10% уксусная кислота/ PBS
Пептиды Ага h 2											
8	A+B	SQLERANLRPSEQHLM	32-47 C42S	16 аминокислот	PBS	20	A (SEQ ID NO:133)	SQLERANLRPSEQ	32-44 C42S	13 аминокислот	PBS
						21	B (SEQ ID NO:134)	ANLRPSEQHLM	37-47 C42S	11 аминокислот	PBS
9	C+D	ELNEFENNQRSMSEALQ	91-107 C1101+103JS	17 аминокислот	0.1M NH4HCO3	22	C (SEQ ID NO:135)	ELNEFENNQRSM	91-102 C101S	12 аминокислот	0.1M NH4HCO3
						23	D (SEQ ID NO:136)	EFENNQRSMSEALQ	94-107 C1101+103JS	14 аминокислот	0.1M NH4HCO3
10	E	RELRLNPQOASGLRA	128-141 C137S	14 аминокислот	PBS						

• Примечание относительно буферов: сначала все пептиды испытывали в PBS; затем

использовали 0,1М NH₄HCO₃, если предполагалось, что для последовательности предпочтительным является высокое значение рН, или 1% уксусную кислоту для низкого значения рН; причем если не был растворимым в 1% уксусной кислоте, увеличивали до 2, 5, 10% и т. д.

- 5 • N-концевую 'W' удаляли из 'пептида 2 для улучшения стабильности и простоты синтеза.
- С-концевую 'E' добавляли в 'пептид 7 для улучшения растворимости (в ином случае пептид был нерастворимым, за исключением токсичных буферов)

Критерии выбора конечных пептидов

10 Цели:

Доведение до максимума охвата популяции и/или Т-клеточной реактивности и в то же время сведение к минимуму количества и/или длины последовательностей.

Расширенные критерии выбора пептидов:

- 15 • сравнение Т-клеточных ответов в ходе скрининга 23 пептидов;
- предшествующие данные относительно Т-клеточной реактивности (для отдельных Т-клеточных эпитопов/пептидов);
- последовательность (простота получения/растворимость);
- HLA-рестрикция (наиболее вырожденные и HLA-DQ-рестриктированные Т-клеточные эпитопы).

20 Критерии выбора исходя из данных скрининга 23 пептидов:

- главные критерии оценки основаны на значениях SI для клеток CD25+CFSE-low;
- частота ответа на пептид у донора при одной или обеих концентрациях;
- сравнение ответов на длинные варианты и короткие варианты;
- сила/однородность ответов (т.е. у тех субъектов, у которых наблюдается ответ на 25 обе концентрации, по сравнению с теми, у которых наблюдается ответ только на одну концентрацию);
- паттерны ответов.

В таблице 20 показан анализ Т-клеточных ответов РВМС на полный набор из 23 кандидатных пептидов у 34 субъектов с аллергией на арахис. Эти данные демонстрируют 30 значения SI для % CD25+CFSElow CD4+ Т-клеток с использованием пептида/без стимуляции.

Данные сгруппированы для длинной и короткой версии каждого участка, содержащего Т-клеточный эпитоп (см. рамки вокруг столбцов; например, 1-ая 'группа' = пептиды 1, 23 и 24 [пептид 1 объединяет перекрывающиеся пептиды 23 и 24, каждый 35 из которых содержит отдельный Т-клеточный эпитоп]). В кратком описании в нижней части каждой группы приведены комментарии относительно оптимального пептида, выбранного из этой группы. (Данные демонстрируют значения SI для % CD25+CFSElow CD4+ Т-клеток с использованием пептида/без стимуляции).

Данные отсортированы в порядке убывания для 50 мкг образца длинной версии для 40 каждой 'группы' пептидов (или 10 мкг образца, если ответы были лучше при этой дозе). В каждой строке в группе пептидов показаны данные для одного субъекта, но порядок субъектов различается в каждой группе пептидов.

Таблица 20. Краткое описание ответов на панель из 23 пептидов в расширенной когорте из 34

45

При помощи темно-серых прямоугольников указаны группы с допустимыми альтернативными пептидами для добавления/замены в рассматриваемом

объединенном образце.

Название на этом экране	1	11	12	2	13	3	14	15
Исходное название	Коровы 23+24	23 коровы	24 коровы	Коровы 40	40 коротких коровы	Коровы 46+47	46 коровы	47 коровы
Ид-рестрикции	DR	DR	DR	DO	DO	DR	DR	DR
Последовательность	FOULONHIV/OLEAKRPTLV	FOULONHIV	RIV/OLEAKRPTLV	STSSSENNEGV/KV/SKE	ENNEGGV/KV/SKE	NNFGK/LE/KRDKKIPQLO	NNFGK/LE/KRDKKIPQ	EUKRDKKIPQLO
Длина	20 аминокислот	10 аминокислот	13 аминокислот	18 аминокислот	13 аминокислот	19 аминокислот	17 аминокислот	12 аминокислот
Остатки	206-225	206-215	213-225	354-371	359-371	409-427	409-425	416-427
Концентрация	пептид 1 (10)	пептид 11 (10)	пептид 12 (10)	пептид 2 (10)	пептид 13 (10)	пептид 3 (10)	пептид 14 (10)	пептид 15 (10)
CD25+CFSEю								
	10.3	219.4	2.2	1.0	7.4	8.4	2.0	1.0
	3.0	199.9	1.0	1.4	3.0	1.2	1.8	7.5
	0.0	159.2	0.0	1.5	0.0	1.0	2.0	2.0
	66.6	198.4	13.4	6.0	1.5	1.0	7.6	6.4
	4.3	48.9	0.1	3.1	0.3	0.0	6.0	6.0
	4.8	48.4	0.0	0.0	1.0	2.3	5.9	1.1
	2.7	47.2	2.5	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	43.3	0.0	0.0	1.3	4.9	4.9	1.3
	2.5	36.4	1.2	0.9	0.6	0.3	1.5	4.6
	7.0	32.8	0.1	0.5	0.2	0.2	4.6	4.1
	6.5	19.7	33.7	11.5	1.1	1.0	3.9	3.9
	1.2	8.3	0.6	0.5	0.8	0.4	0.1	3.5
	1.8	7.6	2.2	3.6	0.7	1.2	2.7	3.1
	1.4	7.2	0.4	0.8	0.4	0.4	1.5	2.0
	1.5	7.0	1.1	3.1	3.9	2.2	0.9	1.9
	0.1	7.0	0.8	2.6	0.2	0.7	1.0	0.2
	4.0	6.8	0.9	0.0	0.5	0.0	0.4	1.3
	3.2	5.8	1.1	0.8	1.6	1.3	0.0	1.3
	0.5	4.1	1.1	1.5	2.7	1.2	1.1	1.2
	2.0	4.0	0.3	0.3	2.3	0.0	8.9	8.9
	0.4	3.6	3.0	3.5	4.1	3.6	1.3	1.1
	0.5	3.4	0.0	2.0	0.7	0.0	1.7	1.1
	4.1	2.3	8.6	1.9	5.6	5.1	1.2	1.0
	1.4	2.1	0.4	0.6	0.6	0.4	0.7	1.0
	1.7	2.0	3.6	0.3	2.1	1.0	3.7	3.7
	1.9	1.6	0.5	0.4	0.5	0.3	0.6	1.7
	1.3	1.5	1.0	0.4	0.9	0.4	0.4	0.0
	2.3	1.5	1.0	1.1	0.9	1.3	0.3	0.4
	3.1	1.4	0.6	3.5	1.5	5.0	0.8	0.8
	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.1	0.6	0.2
	4.7	0.6	0.8	0.8	1.4	2.8	0.1	0.5
	0.4	0.6	0.1	1.8	2.0	1.0	0.0	0.0
	19.3	0.0	4.0	0.0	5.0	0.0	0.0	0.0
	1.3	0.0	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0
Комментарии	Лучший вариант = пептид 1							
Положительный SI ≥	31/34 респондоров с наиболее сильными ответами на длинный по сравнению с коротким							
у 9 (из 31) респондоров, также длинная версия (а не короткая версия), что указывает на наличие дополнительного эпигена в пределах длинной версии, не пересекающегося с короткими версиями								
1 субъект, у которого наблюдался ответ на короткую версию, но не на длинную версию								
При выборе короткой версии 11 лучше, чем 12: больше респондоров: лучше ответ								
17/34 респондоров на пептид 11, у 8 не респондировали пептид 12								
14/34 респондоров на пептид 12, у 5 не респондировали пептид 11								
	21/34 респондоров по сравнению с 15 для короткой версии							
	28/34 респондоров на пептид 3 и пептид 5, (каждый с относительно сильными ответами							
	4 субъекта, у которых наблюдался ответ на короткий, но не на длинный, 4 субъекта, у которых наблюдался ответ на длинный, но не на короткий							
	Использование пептида 14 в дополнении к 15 не увеличивает положительный эффект							
	Возможно применение 3 на этой группе в альтернативной смеси							

5

101520253035404.

Таблица 20 (продолжение)

8	A+B	20	21	9	22	23	0
DR+DR	A		B	C+D	C	D	IR
SOLEARNLRPSECHLM	DR	SOLEARNLRPSEO	DR+DR	ELNEFENNORSANEALO	DR	DR	ELRNLRPOOSGLRA
16 аминокислот	13 аминокислот	11 аминокислот	17 аминокислот	12 аминокислот	14 аминокислот	94-107 C101+103JS	28-141 C13TS
32-47 C42S	32-44 C42S	37-47 C42S	91-107 C101+103JS	91-102C101S	94-107 C101+103JS	28-141 C13TS	
пептид 8 (10)	пептид 20 (10)	пептид 20 (50)	пептид 21 (10)	пептид 9 (10)	пептид 22 (10)	пептид 23 (10)	пептид 10 (10)
102	958	1,0	1,0	80,0	85,2	24,5	4,0
15,8	80,5	7,6	14,5	7,9	13,4	18,4	17,6
1,5	18,8	2,4	0,0	1,0	3,5	7,5	1,2
0,8	8,9	5,1	14,4	18,0	0,9	7,2	1,9
2,3	7,0	3,5	12,0	4,5	5,6	7,1	1,5
5,3	4,9	2,6	15,5	12,1	1,1	5,1	1,9
1,0	3,6	1,0	0,5	0,5	3,3	5,0	3,0
0,0	3,0	2,0	0,0	4,8	1,6	4,9	3,3
1,1	2,7	2,3	2,8	2,0	2,5	4,1	2,1
3,8	2,6	1,0	0,6	1,0	4,0	1,7	9,0
1,3	2,0	0,5	5,9	6,5	2,0	4,0	4,0
2,5	2,0	4,1	7,2	2,1	2,1	3,2	3,9
2,1	1,6	3,6	8,2	4,7	0,6	2,4	3,8
1,8	1,5	0,4	2,0	2,2	1,8	2,2	4,2
3,0	1,5	0,0	2,5	1,9	0,1	0,2	0,4
1,3	1,3	0,6	1,5	1,5	0,5	1,8	0,1
3,1	1,3	0,8	1,4	1,0	0,0	1,7	1,3
0,0	1,3	2,1	1,2	0,7	1,4	1,4	1,4
0,0	1,3	0,0	2,5	8,8	1,3	1,3	1,3
1,1	1,1	1,0	1,3	1,3	5,3	1,1	2,0
0,2	1,1	0,7	2,1	1,7	0,6	1,0	2,0
12,8	1,0	112,4	4,0	3,0	7,8	0,9	0,0
3,5	1,0	4,9	7,4	2,5	40,0	0,8	0,0
2,1	0,9	7,4	1,1	8,1	1,0	0,9	0,0
0,4	0,8	9,2	7,4	0,3	0,6	1,9	1,9
1,3	0,8	0,2	1,5	11,4	2,3	0,3	1,3
0,4	0,8	0,2	1,1	0,5	0,3	1,5	1,2
1,2	0,7	1,3	1,1	1,2	1,0	0,0	4,0
0,3	0,6	0,1	0,7	0,9	0,0	2,5	3,8
1,5	0,4	3,4	1,4	3,0	0,0	1,0	2,3
0,1	0,1	0,1	0,3	1,4	0,0	0,0	0,0
0,1	0,1	0,5	0,4	1,2	0,9	0,0	4,1
0,3	0,0	1,7	1,7	3,2	0,0	1,3	2,5
2,0	0,0	0,0	2,0	1,0	0,0	0,0	0,0
Лучший вариант = пептид 21				Лучший вариант = пептид 23			
28/34 респондеров				29/34 респондеров, относительно хорошие ответы (27/34 на пептид 9 и пептид 22)			Умеренные ответы
25/34 респондеров на пептид 8 и 26/34 на пептид 20				Ни у одного не распознавался и длинный, и короткий, у 5 распознавался короткий, но не длинный			Проблемы с пептидной защитой связаны с 9, 22 и/или 23, может требоваться включение пептида 10 для увеличения охвата популяции
Использование пептидов 20+21 = 6 дополнительных субъектов по сравнению с использованием пептида 8 (всего 30/34 респондеров)							
У 2 респондеров на пептид 20 не распознавался пептид 21, но у 4 респондеров на 21 не распознавался пептид 20							
Достигается охват только 2 дополнительных субъектов при добавлении 22, но предположительно, возникли проблемы с этой порцией пептида 22, так что он может оказывать лучше, чем представлено здесь.							
Возможно применение 8 или 20 из этой группы в альтернативной смеси							
Возможно применение 9 или 22 из этой группы в альтернативной смеси							

Таблица 21. Альтернативное краткое описание Т-клеточных ответов РВМС на полный набор кандидатных пептидов у 25 субъектов с аллергией на арахис

5

10

15

20

25

30

35

40

45

1	11	12	2	13	3	14	15	4	5
коровы 23+24 DR	23 коровы DR	24 коровы DR	коровы 40 DQ	40 короткотий коровы DQ	коровы 46+47 DR	46 коровы DR	47 коровы DR	коровы 49 DQ+DR	коровы 50 DR
FONLONHVVQIEAKPNTLV	FONLONHVV	RVOIEAKPNTLV	STRSENNEGVV/KV/SKE	ENNEGVV/KV/SKE	INFGKLEVKRDKKIPQLO	INFGKLEVKRDKKIPQLO	EVKRDKKIPQLO	VEKEGALMLPHNSKA	ALMLPHNSKAMVVVV
20 аминокислот	10 аминокислот	13 аминокислот	18 аминокислот	13 аминокислот	19 аминокислот	17 аминокислот	12 аминокислот	17 аминокислот	17 аминокислот
206-225	206-215	213-225	354-371	359-371	409-427	409-425	416-427	436-452	442-456
пептид 1 (10)	пептид 1 (50)	пептид 11 (10)	пептид 11 (50)	пептид 12 (10)	пептид 12 (50)	пептид 13 (10)	пептид 13 (50)	пептид 14 (10)	пептид 14 (50)
88,6	218,0	57,1	115,0	5,6	5,1	8,5	8,4	6,8	5,0
19,1	197,0	10,4	115,3	4,1	5,0	7,4	6,8	5,0	17,1
10,9	108,4	8,6	10,4	3,9	5,0	7,2	6,0	4,1	11,6
7,0	48,4	4,0	3,6	3,8	3,6	6,6	5,9	3,3	3,7
6,5	47,2	3,6	3,5	2,7	2,2	4,6	5,0	2,1	2,0
4,8	43,0	3,0	3,5	2,3	1,3	2,7	4,8	2,0	1,9
4,1	36,4	2,5	3,1	2,1	1,2	2,4	4,6	1,7	1,6
3,1	32,8	2,2	2,6	2,0	1,2	2,3	4,6	1,5	1,6
2,7	19,3	2,2	2,0	1,8	1,0	2,0	3,8	3,1	1,5
2,3	8,3	1,2	1,9	1,5	1,0	1,7	3,1	1,3	1,3
2,3	7,6	1,1	1,5	1,3	1,0	1,5	2,0	1,3	1,3
2,0	7,2	1,1	1,3	1,1	1,0	1,5	2,0	1,2	1,0
1,8	7,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,3	2,0	1,0	1,0
1,7	4,1	1,0	1,0	0,9	1,0	1,2	1,3	1,0	1,0
1,5	4,0	0,6	1,0	0,9	0,9	1,0	1,2	0,9	0,9
1,4	3,6	0,6	0,9	0,8	0,6	1,0	1,1	0,6	0,9
1,4	3,4	0,4	0,8	0,8	0,7	0,9	1,0	0,6	0,8
1,3	2,3	0,4	0,6	0,7	0,5	0,8	0,9	0,4	0,3
1,2	2,1	0,3	0,5	0,7	0,3	0,8	0,4	0,3	0,2
0,9	1,8	0,1	0,5	0,6	0,2	0,5	0,3	0,2	0,1
0,9	1,5	0,0	0,3	0,4	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0
0,6	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3,6	6,9	3,0	2,9	3,0	5,1	4,3	3,3	3,1	2,8
3,2	5,5	2,2	2,7	2,6	1,7	3,0	2,4	2,3	2,1
2,8	4,3	2,2	2,1	1,4	1,4	1,9	2,3	2,0	1,9
2,1	4,3	2,1	2,0	1,3	1,4	1,8	2,3	2,0	1,6
2,0	3,4	2,1	1,8	1,2	1,2	1,6	1,4	1,5	1,4
1,8	2,9	1,3	1,2	1,1	1,2	1,8	1,3	1,4	1,6
1,8	2,8	1,3	1,2	1,1	1,2	1,8	1,3	1,4	1,6
1,8	2,8	1,2	1,2	1,0	1,2	1,8	1,3	1,4	1,6
1,7	2,7	1,2	1,2	1,0	1,1	1,5	1,4	1,2	1,2
1,7	2,7	1,1	1,1	1,0	1,1	1,4	1,4	1,2	1,2
1,6	2,6	1,0	1,1	1,0	1,1	1,3	1,2	1,1	1,1
1,4	2,4	0,9	1,1	1,0	1,0	1,3	1,2	1,0	1,0
1,4	2,1	0,9	1,0	1,0	0,9	1,1	1,2	1,0	1,0
1,3	2,0	0,9	1,0	0,9	0,9	1,1	1,2	1,0	0,9
1,3	1,8	0,9	1,0	0,9	0,9	1,1	1,2	1,0	0,8
1,2	1,6	0,9	0,9	0,9	0,8	1,1	1,1	1,0	0,8
1,2	1,6	0,9	0,8	0,8	0,8	1,0	1,0	0,9	0,8
1,1	1,6	0,9	0,8	0,8	0,7	1,0	1,0	0,8	0,8
1,1	1,5	0,8	0,7	0,8	0,7	0,9	0,9	0,7	0,7
1,1	1,2	0,8	0,7	0,8	0,7	0,9	0,9	0,7	0,6
1,0	1,1	0,8	0,7	0,7	0,6	0,9	0,7	0,6	0,6
1,0	1,1	0,7	0,6	0,7	0,6	0,9	0,6	0,5	0,5
1,0	1,0	0,6	0,6	0,7	0,5	0,7	0,6	0,5	0,5
1,0	0,8	0,5	0,6	0,5	0,4	0,5	0,3	0,3	0,3
0,9	0,3	0,1	0,0	0,5	0,2	0,5	0,2	0,1	0,0
0,9	0,3	0,1	0,0	0,5	0,2	0,5	0,2	0,1	0,0
3,6	6,9	3,0	2,9	3,0	5,1	4,3	3,3	3,1	2,8
3,2	5,5	2,2	2,7	2,6	1,7	3,0	2,4	2,3	2,1
2,8	4,3	2,2	2,1	1,4	1,4	1,9	2,3	2,0	1,9
2,1	4,3	2,1	2,0	1,3	1,4	1,8	2,3	2,0	1,6
2,0	3,4	2,1	1,8	1,2	1,2	1,6	1,4	1,5	1,4
1,8	2,9	1,3	1,2	1,1	1,2	1,8	1,3	1,4	1,6
1,8	2,8	1,3	1,2	1,1	1,2	1,8	1,3	1,4	1,6
1,8	2,8	1,2	1,2	1,0	1,2	1,8	1,3	1,4	1,6
1,7	2,7	1,2	1,2	1,0	1,1	1,5	1,4	1,2	1,2
1,7	2,7	1,1	1,1	1,0	1,1	1,4	1,4	1,2	1,2
1,6	2,6	1,0	1,1	1,0	1,1	1,3	1,2	1,1	1,1
1,4	2,4	0,9	1,1	1,0	1,0	1,3	1,2	1,0	1,0
1,4	2,1	0,9	1,0	0,9	0,9	1,1	1,2	1,0	0,9
1,3	2,0	0,9	1,0	0,9	0,9	1,1	1,2	1,0	0,8
1,3	1,8	0,9	1,0	0,9	0,8	1,1	1,1	1,0	0,8
1,2	1,6	0,9	0,9	0,9	0,8	1,1	1,1	1,0	0,8
1,2	1,6	0,9	0,8	0,8	0,7	1,0	1,0	0,9	0,8
1,1	1,6	0,9	0,8	0,8	0,7	1,0	1,0	0,8	0,8
1,1	1,5	0,8	0,7	0,8	0,7	0,9	0,9	0,7	0,7
1,1	1,2	0,8	0,7	0,7	0,6	0,9	0,7	0,6	0,6
1,0	1,1	0,8	0,7	0,7	0,6	0,9	0,6	0,5	0,5
1,0	1,1	0,7	0,6	0,7	0,5	0,7	0,6	0,5	0,5
1,0	1,0	0,6	0,6	0,7	0,5	0,7	0,6	0,5	0,5
1,0	0,8	0,5	0,6	0,5	0,4	0,5	0,3	0,3	0,3
0,9	0,3	0,1	0,0	0,5	0,2	0,5	0,2	0,1	0,0
0,9	0,3	0,1	0,0	0,5	0,2	0,5	0,2	0,1	0,0
3,6	6,9	3,0	2,9	3,0	5,1	4,3	3,3	3,1	2,8
3,2	5,5	2,2	2,7	2,6	1,7	3,0	2,4	2,3	2,1
2,8	4,3	2,2	2,1	1,4	1,4	1,9	2,3	2,0	1,9
2,1	4,3	2,1	2,0	1,3	1,4	1,8	2,3	2,0	1,6
2,0	3,4	2,1	1,8	1,2	1,2	1,6	1,4	1,5	1,4
1,8	2,9	1,3	1,2	1,1	1,2	1,8	1,3	1,4	1,6
1,8	2,8	1,3	1,2	1,1	1,2	1,8	1,3	1,4	1,6
1,8	2,8	1,2	1,2	1,0	1,2	1,8	1,3	1,4	1,6
1,7	2,7	1,2	1,2	1,0	1,1	1,5	1,4	1,2	1,2
1,7	2,7	1,1	1,1	1,0	1,1	1,4	1,4	1,2	1,2
1,6	2,6	1,0	1,1	1,0	1,1	1,3	1,2	1,1	1,1
1,4	2,4	0,9	1,1	1,0	1,0	1,3	1,2	1,0	1,0
1,4	2,1	0,9	1,0	0,9	0,9	1,1	1,2	1,0	0,9
1,3	2,0	0,9	1,0	0,9	0,8	1,1	1,1	1,0	0,8
1,3	1,8	0,9	1,0	0,9	0,8	1,1	1,1	1,0	0,8
1,2	1,6	0,9	0,9	0,9	0,8	1,1	1,1	1,0	0,8
1,2	1,6	0,9	0,8	0,8	0,7	1,0	1,0	0,9	0,8
1,1	1,6	0,9	0,8	0,8	0,7	1,0	1,0	0,8	0,8
1,1	1,5	0,8	0,7	0,8	0,7	0,9	0,9	0,7	0,7
1,1	1,2	0,8	0,7	0,7	0,6	0,9	0,7	0,6	0,6
1,0	1,1	0,8	0,7	0,7	0,6	0,9	0,6	0,5	0,5
1,0	1,1	0,7	0,6	0,7	0,5	0,7	0,6	0,5	0,5
1,0	1,0	0,6	0,6	0,7	0,5	0,7	0,6	0,5	0,5
1,0	0,8	0,5	0,6	0,5	0,4	0,5	0,3	0,3	0,3
0,9	0,3	0,1	0,0	0,5	0,2	0,5	0,2	0,1	0,0
0,9	0,3	0,1	0,0	0,5	0,2	0,5	0,2	0,1	0,0
3,6	6,9	3,0	2,9	3,0	5,1	4,3	3,3	3,1	2,8
3,2	5,5	2,2	2,7	2,6	1,7	3,0	2,4	2,3	2,1
2,8	4,3	2,2	2,1	1,4	1,4	1,9	2,3	2,0	1,9
2,1	4,3	2,1	2,0	1,3	1,4	1,8	2,3	2,0	1,6
2,0	3,4	2,1	1,8	1,2	1,2	1,6	1,4	1,5	1,4
1,8	2,9	1,3	1,2	1,1	1,2	1,8	1,3	1,4	1,6
1,8	2,8	1,3	1,2	1,1	1,2	1,8	1,3	1,4	1,6
1,8	2,8	1,2	1,2	1,0	1,2	1,8	1,3	1,4	1,6
1,7	2,7	1,2	1,2	1,0	1,1	1,5	1,4	1,2	1,2
1,7	2,7	1,1	1,1	1,0	1,1	1,4	1,4	1,2	1,2
1,6	2,6	1,0	1,1	1,0	1,1	1,3	1,2	1,1	1,1
1,4	2,4	0,9	1,1	1,0	1,0	1,3	1,2	1,0	1,0
1,4	2,1	0,9	1,0	0,9	0,9	1,1	1,2	1,0	0,9
1,3	2,0	0,9	1,0	0,9	0,8	1,1	1,1	1,0	0,8
1,3	1,8	0,9	1,0	0,9	0,8	1,1	1,1	1,0	0,8
1,2	1,6	0,9	0,9	0,9	0,8	1,1	1,1	1,0	0,8
1,2	1,6	0,9	0,8	0,8	0,7	1,0	1,0	0,9	0,8
1,1	1,6	0,9	0,8	0,8	0,7	1,0	1,0	0,8	0,8
1,1	1,5	0,8	0,7	0,8	0,7	0,9	0,9	0,7	0,7
1,1	1,2	0,8	0,7	0,7	0,6	0,9	0,7	0,6	0,6
1,0	1,1	0,8	0,7	0,7	0,6	0,9	0,6	0,5	0,5
1,0	1,1	0,7	0,6	0,7	0,5	0,7	0,6	0,5	0,5
1,0	1,0	0,6	0,6	0,7	0,5	0,7	0,6	0,5	0,5
1,0	0,8	0,5	0,6	0,5	0,4	0,5	0,3	0,3	0,3
0,9	0,3	0,1	0,0	0,5	0,2	0,5	0,2	0,1	0,0
0,9	0,3	0,1	0,0	0,5	0,2	0,5	0,2	0,1	0,0
3,6	6,9	3,0	2,9	3,0	5,1	4,3	3,3	3,1	2,8
3,2	5,5	2,2	2,7	2,6	1,7	3,0	2,4	2,3	2,1
2,8	4,3	2,2	2,1	1,4	1,4	1,9	2,3	2,0	1,9
2,1	4,3	2,1	2,0	1,3	1,4	1,8	2,3	2,0	1,6
2,0	3,4	2,1	1,8	1,2	1,2	1,6	1,4	1,5	1,4
1,8	2,9	1,3	1,2	1,1	1,2	1,8	1,3	1,4	1,6
1,8									

[illegible]

Краткое описание ответов на панель из 23 пептидов в когорте из 34

Данные указывают на то, что выбранные 7 пептидов представляют собой наилучшую комбинацию, однако, при помощи прямоугольников указаны группы, содержащие другие пептиды, приемлемые в качестве замен (или добавлений) в рассматриваемом объединенном образце.

5 Например:

1) пептидом 3 можно было бы заместить пептид 15;

2) пептидом 8 можно было бы заместить пептид 21;

3) пептидом 9 можно было бы заместить пептид 23;

10 *Таблица 22. Краткое описание ответов на каждый пептид из смеси 7 пептидов в когорте из 39*

15

20

25

30

35

40

45

Контроль										Новый объединенный образец 7b										Расхождение пептиды																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
										Пептиды Ами h 1										Пептиды Ами h 2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
										KQNLNFRVQAEKRN					STRSNNVEGVAVNSKSE					EYAPKKNVPOLO					VEDEGALMDEKNSKA					VFRDPAHVPVASS					ANLPSEPHLM					EENNQVRMSKPALO																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
										20 аминокислот					18 аминокислот					12 аминокислот					17 аминокислот					16 аминокислот					11 аминокислот					14 аминокислот																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
										206-225					354-371					416-427					436-452					509-524					574-625					94-107 C[101+103]S																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
Испытания										Ами1					Ами2					пептид 1					пептид 2 (10)					пептид 4					пептид 15					пептид 19					пептид 21					пептид 23																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
Количество субъектов										СРЕ					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50					10					50				

Краткое описание ответов на каждый пептид из смеси 7 пептидов в когорте из 39

- Во всех случаях распознавался 1 или несколько пептидов,
- у 13/39 (33%) распознавались 100% пептидов,
- у 21/39 (54%) распознавались >85% (6 или более) пептидов,
- у 31/39 (79%) распознавались >70% (5 или более) пептидов,
- каждый пептид распознавался по меньшей мере у 25/39 субъектов (64%).

У всех из 74 протестированных субъектов наблюдалась реакция по меньшей мере на 1 пептид из 7 выбранных пептидов.

Ответы на различные объединенные образцы пептидов

Таблица 23

Пептид №	Коровый	Объединенный образец 1	Объединенный образец 2	Объединенный образец 3	Объединенный образец 4	Объединенный образец 5	Объединенный образец 7 а	Объединенный образец 7 б	Растворитель
1	23+24	X		X			x	x	2% кислота
2	40	X		X			x	x	PBS
3	46+47	X		X	X				PBS
4	49	X		X	X		x	x	PBS
5	50	X		X	X				1% кислота
6	51	X		X					10% кислота
7	57	X		X					0,1M
8	A+B		X	X					PBS
9	C+D		X	X					0,1M
10	E		X	X		X	x		PBS
11	23				X				PBS
12	24				X				PBS
13	40 короткий				X				PBS
14	46								PBS
15	47						x	x	PBS
16	50/51								10% кислота
17	51a								10% кислота
18	51b				X				PBS
19	57 короткий				X		x	x	1% кислота
20	A					X			PBS
21	B					X	x	x	PBS
22	C					X			0,1M
23	D					X	x	x	0,1M

Примечание: В таблице 19 представлены последовательности для каждого из пептидов 1-23.

Объединенный образец 1 = 7 х исходных 'кандидатов' Ara h 1.

Объединенный образец 2 = 3 х исходных 'кандидатов' Ara h 2.

Объединенный образец 3 = 10 х смесь вышеуказанных 2 объединенных образцов (Ara h 1 и 2).

Объединенный образец 4 = 3 х 'кандидатов' Ara h 1 + 5 х более коротких вариантов (охват последовательности Ara h 1, эквивалентный объединенному образцу 1).

Объединенный образец 5 = 5 х более коротких (одиночный эпитоп) вариантов кандидатов Ara h 2 (охват последовательности Ara h 2, эквивалентный объединенному образцу 2).

Таблица 24. Улучшенный объединенный образец пептидов

Пептид Vax						
Исходное название	№	HLA	Последовательность	Остатки	аминокислоты	Примечания
Коровый 23+24	1	DR	FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV	Ara h 1 [206-225]	20	Содержит 2 основных эпитопа Ara h 1, присутствующих в запатентованном Ara h 1 для Т-клеток
Коровый 40	2	DQ	STRSSENNEGVIVKVSKE	Ara h 1 [354-371]	18	*ключевая последовательность, выделенная

5							в запатентованном Ara h 1, но короче на один остаток для обеспечения стабильности; при этом содержит один основной Т-клеточный эпитоп Ara h 1
10	Коровый 47	15	DR	EVKPDKKNPQLQ	Ara h 1 [416-427]	12	Укороченная версия кандидатного пептида в запатентованном Ara h 1; при этом содержит 1 Т-клеточный эпитоп Ara h 1. Индуцированы эквивалентные Т-клеточные ответы на более длинную версию, содержащую дополнительный Т-клеточный эпитоп, при скрининге 25 новых субъектов
15	Коровый 49	4	DR/DQ	VEIKEGALMLPHFNSKA	Ara h 1 [436-452]	17	*ключевая последовательность, выделенная в запатентованном Ara h 1
20	Коровый 57 (короткий)	19	DR/DQ	VFIMPAANPVAINASS	Ara h 1 [509-524]	16	*укороченная версия ключевой последовательности, выделенной в запатентованном Ara h 1; более простое получение и более растворимая; при этом индуцированы эквивалентные Т-клеточные ответы на более длинную версию, содержащую дополнительный эпитоп, при скрининге 25 новых субъектов
25							
30	B	21	DR/DQ	ANLRPSEQHLM	Ara h 2 [37-47] C42S	11	Индуцированы эквивалентные Т-клеточные ответы на более длинную версию, содержащую дополнительный Т-клеточный эпитоп, при скрининге 25 новых субъектов
35	D	23	DQ	EFENNQRSMSEALQ	Ara h 2 [94-107] C [101+103]S	14	Индуцированы эквивалентные Т-клеточные ответы на более длинную версию, содержащую дополнительный Т-клеточный эпитоп, при скрининге 25 новых субъектов; при этом он длиннее на один остаток, чем коровый Т-клеточный эпитоп, представленный в документе, который имеет отношение к Ara h 2.

40 Объединенный образец 7a = 5 x Ara h 1 + 3 x Ara h 2 для 'улучшенного' объединенного образца (такой же, что и конечный объединенный образец, но с дополнительным Т-клеточным эпитопом Ara h 2).

Объединенный образец 7b = 5 x Ara h 1 + 3 x Ara h 2 для 'улучшенного' объединенного образца 7.

45 *Ответы базофилов на объединенный образец 7 пептидов (объединенный образец 7b)*

Данные относительно реактивности базофилов собирали для 14 субъектов с аллергией на арахис после инкубации с арахисом (CPE) или объединенным образцом 7 пептидов (объединенный образец 7b) при 3-4 log диапазоне концентрации (мкг/мл) (Фигура 2). У

этих субъектов активацию базофилов и высвобождение гистамина индуцировали цельным арахисом и положительными контролями, но не смесью 7 пептидов.

Перед выбором объединенных образцов 7а и 7б. Объединенные образцы 7а и 7б последовательно создавали и тестировали.

5 Т-клеточные ответы РВМС сравнивали с таковыми для цельного арахиса и объединенных образцов пептидов 1-5 из таблицы 23. (Фигуры 12 и 13). Что касается объединенных образцов 1-5, ни один из этих объединенных образцов не был способен индуцировать положительный Т-клеточный ответ у всех протестированных субъектов. Почти все ответы на объединенный образец пептидов были значительно ниже, чем на
10 цельный арахис (при протестированных концентрациях), и при этом для каждого из объединенных образцов 2, 3 и 4 только у одного субъекта наблюдался больший или одинаковый ответ на эти пептиды по сравнению с цельным арахисом. Что касается объединенных образцов 7а и 7б, 100% ответ был описан для объединенных образцов 7а и 7б ($SI > 1,5$). Объединенные образцы 7а и 7б индуцировали сопоставимые или
15 большие ответы, чем цельный арахис, у многих субъектов, причем у $6/30 = \geq 100$ для ответа на СРЕ, у $6/30 = 50-80\%$ ответа на СРЕ.

При сравнении Т-клеточных ответов РВМС на объединенный образец 7 пептидов (Фигура 14) не наблюдались значимые различия между объединенными образцами 7а и 7б (сравнение парных данных; $n = 15$ на группу; при этом добавление 3-его пептида
20 Ага h 2 не приводило к какому-либо преимуществу). Не наблюдались значимые различия при сравнении полных наборов данных для объединенного образца 7б ($n=30$) с когортой для объединенного образца 7а при помощи непарного критерия Манна-Уитни для непараметрических данных; $p = 0,9$).

Вкратце, оба объединенных образца 7а и 7б были значимо лучше, чем другие 5
25 протестированных объединенных образцов. Не наблюдались значимые различия для объединенного образца 7а по сравнению с объединенным образцом 7б. Объединенный образец 7б распознавался у 100% протестированных субъектов и индуцировал сопоставимые или большие Т-клеточные ответы РВМС, чем арахис, у более 33% субъектов. Объединенные образцы 1-5 не распознавались у 100% субъектов и очень
30 редко индуцировали одинаковые ответы по сравнению с цельным арахисом.

ТАБЛИЦА 25. Более подробное описание стадий и данных

Подход	Результаты
1) Идентификация доминантных Т-клеточных эпитопов основных аллергенов арахиса Ага h 1 и Ага h 2	
35 Выделяли CD4+ Т-клетки, специфичные в отношении Ага h 1 или Ага h 2, из РВМС от субъектов с аллергией на арахис.	145 линий Т-клеток, специфичных в отношении Ага h 1 (TCL) (18 субъектов). 69 TCL, специфичных в отношении Ага h 2 (16 субъектов). Всего = 214 TCL от 20 субъектов.
Определяли специфичность в отношении перекрывающихся 20-мерных пептидов, охватывающих всю последовательность Ага h 1 или 2 и выбирали доминантные 20-меры.	9 (из 69) доминантных 20-меров Ага h 1. 4 (из 17) доминантных 20-меров Ага h 2.
40 Подтверждали, что доминантные 20-меры могли целенаправленно воздействовать на Т-клетки из РВМС у субъектов с аллергией на арахис (скрининги при помощи CFSE).	≥ 1 20-мер Ага h 1 выявляли у 17/19. ≥ 1 20-мер Ага h 2 выявляли у 6/6.
Оценивали общую частоту респондеров (объединенные данные, полученные из данных TCL и скринингов при помощи CFSE).	≥ 1 доминантный 20-мер Ага h 1 распознавался у 43/45. ≥ 1 доминантный 20-мер Ага h 2 распознавался у 16/16.
45 Картировали последовательности коровых Т-клеточных эпитопов в пределах доминантных 20-меров.	10 доминантных коровых Т-клеточных эпитопов Ага h 1. 5 доминантных коровых Т-клеточных эпитопов Ага h 2.
2) Определение HLA-рестрикции коровых Т-клеточных эпитопов	
Блокировали презентацию Т-клеточных эпитопов специфичным TCL при помощи антител к HLA. HLA-генотипированных субъектов использовали для получения TCL.	HLA-DR и/или -DQ-рестриктированные Т-клеточные эпитопы Ага h 1. HLA-DR, -DQ и/или -DP-рестриктированные Т-клеточные эпитопы Ага h 2. Все Т-клеточные эпитопы презентировались ≥ 1 молекулой

		HLA.
	Оценивали вырожденность по связыванию с HLA при помощи алгоритмов.	Характеризующиеся сильным связыванием и вырожденные связывающиеся мотивы во всех Т-клеточных эпитопах.
	3) Создание терапевтических кандидатных пептидов	
	Остатки цистеина замещали остатками серина.	Все варианты с серином сохраняли Т-клеточную реактивность.
5	Объединяли перекрывающиеся Т-клеточные эпитопы в пептиды длиной ≤ 20 аминокислот. Создавали более короткие варианты с одиночными Т-клеточными эпитопами.	7 кандидатных пептидов Ara h 1 (Prickett et al 2013). 3 кандидатных пептида Ara h 2 (Prickett et al 2011). 13 более коротких вариантов вышеуказанных кандидатных пептидов.
10	Синтезировали все 23 пептида с обеспечением чистоты, соответствующей GLP. Определяли растворимость в подходящих растворах.	Все пептиды получали с 95-99,9% чистотой. 22/23 пептидов были растворимыми в PBS, 0,1M NH ₄ HCO ₃ или 1-2% уксусной кислоте (1 нерастворимый пептид создавали заново, и в настоящее время новая версия является растворимой; пептид 7 в таблице 18).
	4) Выбор и тестирование конечной терапевтической смеси	
	Сравнивали Т-клеточную реактивность РВМС в отношении всех 23 пептидов (2 дозы) в новой когорте с аллергией на арахис.	Осуществляли скрининг 34 субъектов с использованием всех 23 пептидов. Определяли оптимальные комбинации пептидов.
15	Пептиды, выбранные для конечного терапевтического средства (с учетом Т-клеточных ответов, свойств пептидов, частоты ответа, HLA-рестрикции, патентов).	Выбрали 7 пептидов (5хAra h 1 и 2хAra h 2). Презентировались на HLA-DR (5/7) и/или HLA-DQ (5/7). 1-7 пептидов распознавались у 56/56 доноров.
	Оценивали Т-клеточный ответ РВМС на смесь из 7 пептидов при 2 терапевтических дозах в когорте с аллергией на арахис.	Т-клеточный ответ наблюдался у 24/25 субъектов (часто сопоставимый или больше, чем ответ на арахис).

ПРИМЕР 3

Анергия Т-клеток, индуцированная пептидом Ara h 2, в ТСС, специфичных в отношении эпитопов Ara h 2 (Фигура 15)

Т-клетки (1×10^6 /мл) из клона Т-клеток человека, специфичных в отношении пептида Ara h 2, культивировали в течение 16 часов в присутствии пептида Ara h 2 (ANLRPSEQHLM (SEQ ID NO:31; заштрихованная) при 100 мкг/мл в отсутствие вспомогательных клеток или в полной среде* отдельно (без Ag). Затем Т-клетки тщательно промывали и повторно стимулировали (10^4 /лунка) с использованием полной среды отдельно, 50 ед./мл IL-2 или иммуногенной концентрации пептида Ara h 2 (10 мкг/мл) в присутствии облученных аутологичных РВМС (10^5 /лунка) в качестве вспомогательных клеток. Пролиферацию, которая коррелировала с включением меченого тритием тимидина, определяли в момент времени 72 часа. Результаты выражали в виде среднего значения $\text{cpm} \pm \text{SD}$ для культур в трех повторностях. *Полная среда: RPMI + 5% сыворотка АВ + Pen/Strep/L-глутамин + 10 ед./мл IL-2.

Анергия, индуцированная пептидом Ara h 1, в ТСС, специфичных в отношении эпитопов Ara h 1 (Фигура 16)

Т-клетки (1×10^6 /мл) из клона Т-клеток человека, специфичных в отношении пептида Ara h 1, культивировали в течение 16 часов в присутствии пептида Ara h 1 (STRSSENNEGVIKVSKE (SEQ ID NO:12; заштрихованная) или несоответствующего пептида Pas n 1 гречки заметной при 100 мкг/мл в отсутствие вспомогательных клеток или в полной среде* отдельно (без Ag). Затем Т-клетки тщательно промывали и повторно стимулировали (10^4 /лунка) с использованием полной среды отдельно, 50 ед./мл IL-2 или иммуногенной концентрации пептида Ara h 1 (10 мкг/мл) в присутствии облученных аутологичных РВМС (10^5 /лунка) в качестве вспомогательных клеток. Пролиферацию, которая коррелировала с включением меченого тритием тимидина, определяли в момент времени 72 часа. Результаты выражали в виде среднего значения cpm для культур в трех повторностях. *Полная среда: RPMI + 5% сыворотка АВ + Pen/Strep/L-глутамин + 10 ед./мл IL-2.

Специалисты в данной области техники поймут, что настоящее изобретение,

описанное в данном документе, допускает вариации и модификации, отличные от тех, которые были описаны специально. Следует понимать, что настоящее изобретение охватывает все такие вариации и модификации. Настоящее изобретение также охватывает все стадии, признаки, композиции и соединения, на которые делается ссылка в данном описании или указанные в нем, отдельно или в совокупности, а также любую комбинацию и все комбинации любых двух или более указанных стадий или признаков.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Akdis & Akdis, *J Allergy Clin Immunol.* 123:735-46, 2009
- Akdis & Akdis, *Nature Reviews: Drug Discovery.* 8:645-60. 2009
- 10 Akdis & Akdis, *J Allergy Clin Immunol.* 127:18-27, 2011
- Alexander *et al.* *Clin Exp Allergy* 35: 52-8, 2004
- Alexander *et al.* *Allergy* 60:1269-74, 2005
- Allen & O'Hehir. *Clin Exp Allergy.* 41(9):1172-4, 2011
- Amann *et al.*, 1998, *Gene.*, 69:301-315
- 15 Anagnostou *et al.* *Clin Exp Allergy.* 41(9):1273-81, 2011
- Apostolou E *et al.* 2006. Anaphylaxis to Gelofusine confirmed by an in vitro basophil activation test: a case series. *Anaesthesia*; 61(3):264
- Asarnej *et al.* *Allergy.* 2010, 65(9):1189-95
- Balderi *et al.*, 1987, *Embo J.*, 6:229-234
- 20 Blanc *et al.* *Clin Exp Allergy.* 2009; 39(8):1277-85
- Blumchen *et al.* *J Allergy Clin Immunol.* 126(1):83-91, 2010
- Bock *et al.* *J Allergy Clin Immunol.* 119(4):1016-8, 2007
- Burks *et al.*, *Int Arch Allergy Immunol* 119:165-172, 1992
- Burks *et al.*, *Allergy* 53: 725-30, 1998
- 25 Burks AW. 2008. Peanut allergy. *Lancet*;371(9623):1538
- Chiang *et al.* *Pediatr Allergy Immunol.* 2009; 21(2 Pt 2):e429-38
- Clarke *et al.*, *Clin Exp Allergy* 28: 1251-7, 1998
- Clark *et al.* *Allergy* 64, 1218, 2009
- de Jong *et al.*, *Clin Exp Allergy* 28: 743-51, 1998
- 30 de Leon MP *et al.*, Suphioglu, C. 2003. Immunological analysis of allergenic cross-reactivity between peanut and tree nuts. *Clin Exp Allergy*; 33(9):1273
- Drew AC *et al.* 2004. Hypoallergenic variants of the major latex allergen Hev b 6.01 retaining human T lymphocyte reactivity. *J Immunol.* 173(9):5872-9
- Eusebius NP, Papalia L, Suphioglu C, McLellan SC, Varney M, Rolland JM, *et al.* Oligoclonal analysis of the atopic T cell response to the group 1 allergen of *Cynodon dactylon* (bermuda grass) pollen: pre- and post-allergen-specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;127(3): 234-44
- 35 Fellrath *et al.* *J Allergy Clin Immunol.* 111: 854-61, 2003
- Glaumann *et al.* *Allergy.* 2012; 67(2):242-7
- 40 Hall *et al.* *Vaccine.* 21(5-6):549-61, 2003
- Hofmann *et al.* *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 286, 2009
- Hourihane *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* 100: 596-600, 1997
- Hoyne *et al.* *J Exp Med.* 178(5):1783-8, 1993
- Husain Z, Schwartz RA. 2012. Peanut allergy: an increasingly common life-threatening disorder. *J Am Acad Dermatol*;66(1):136
- 45 Jameel *et al.*, 1990, *J. Virol.*, 64:3963-3966
- Jones *et al.* *J. Allergy Clin. Immunol.* 24, 292, 2009
- Kemp *et al.* *Med. J. Aust.* 188(9):503-4, 2008

- Kleber-Janke *et al.*, *Int Arch Allergy Immunol* 119: 265-274, 1999
- Knapp *et al.*, 1990, *Bio Techniques.*, 8:280-281
- Koppelman *et al.* *Allergy*. 2001; 56(2):132-7
- Koppelman *et al.* *Clin Exp Allergy*. 2004; 34(4):583-90
- 5 Kurjan and Herskowitz., 1982, *Cell.*, 30:933-943
- Larch M. 2008. Of cats and men: immunodominance and the role of HLA-DP/DQ. *Clin Exp Allergy*, 38(11):1709
- Lin *et al.* *J Microbiol Immunol Infect.* 2012
- Litwin *et al.*, *Int Arch Allergy Appl Immunol* 87: 361-61, 1998
- 10 Mannering SI, Dromey JA, Morris JS, Thearle DJ, Jensen KP, Harrison LC. An efficient method for cloning human autoantigen-specific T cells. *J Immunol Methods*. 2005;298(1-2):83-92
- Marazuela *et al.* *Mol Immunol*. 45(2):438-45, 2008
- Marcotte *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* 101: 506-13, 1998
- Mittag D, *et al.* 2010. The effector T cell response to ryegrass pollen is counter-regulated by
- 15 simultaneous induction of regulatory T cells. *J Immunol*; 184(9):4708
- Moldaver & Larche, *Allergy* 66: 784-91, 2011
- Moverare *et al.* *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 156(3):282-90
- Muller *et al.* *J Allergy Clin Immunol*. 101: 747-54, 1998
- Nelson *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* 99: 744-51, 1997
- 20 Nopp A, *et al.* 2006. Basophil allergen threshold sensitivity: a useful approach to anti-IgE treatment efficacy evaluation. *Allergy*, 61(3):298
- Norman *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1623-8, 1996
- O'Hehir RE, *et al.* 2009. House dust mite sublingual immunotherapy: the role of TGF-beta and functional regulatory T cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 180(10):936
- 25 Oldfield *et al.* *Lancet* 360:47-53, 2002
- Oppenheimer *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* 90: 256-62, 1992
- Palmer *et al.* *Clin Immunol*. 2005; 115(3):302-12
- Peeters *et al.* *Clin Exp Allergy*. 2007; 37(1):108-15
- Pene *et al.*, *J Allergy Clin Immunol* 102: 571-8, 1998
- 30 Pomés *et al.* 2006, *Clin. Exp. Allergy* 36(6):824-30
- Prickett SR *et al.* 2011. Ara h 2 peptides containing dominant CD4+ T-cell epitopes: candidates for a peanut allergy therapeutic. *J Allergy Clin Immunol*, 127(3):608
- Primeau *et al.*, *Clin Exp Allergy* 30: 1135-43, 2000
- Pumphrey, *Current Opinion in Allergy & Immunology*. 4(4):285-90, 2004
- 35 Rolland *et al.* *Pharmacology & Therapeutics* 121:273-284, 2009
- Rupa *et al.* *Allergy*. 67(1):74-82, 2012
- Sambruck *et al.* (1989)
- Santambrogio *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96:15056-61
- Schultz *et al.*, 1987, *Gene.*, 54:113-123
- 40 Sicherer *et al.*, *Paediatrics* 102: e6, 1998
- Tarzi *et al.* *Clin Exp Allergy*. 36: 465-74, 2006
- Thyagarajan *et al.* *J Allergy Clin Immunol*. 126(1):31-2, 2010
- Varney *et al.* 1991 *British Medical Journal* 302:265-269
- Varshney *et al.* *J Allergy Clin Immunol*. 124(6):1351-2, 2009
- 45 Varshney *et al.* *J Allergy Clin Immunol*. 127(3):654-60, 2011
- Worm *et al.* *J Allergy Clin Immunol*. 127: 89-97, 2011
- Worm *et al.* *Expert Opin. Investig. Drugs*. 22(10): 1347-1357, 2013
- Yang *et al.* *Clin Exp Allergy* 40(4):668-78, 2010

Yoshitomi *et al. J Pept Sci.* 13(8):499-503, 2007

Yu *et al. Int Arch Allergy Immunol.* 159(2):179-182, 2012

Zaunders JJ, *et al.* 2009. High levels of human antigen-specific CD4+ T cells in peripheral blood revealed by stimulated coexpression of CD25 and CD134 (OX40). *J Immunol*; 183(4):2827

5

(57) Формула изобретения

1. Иммуномодулирующая композиция для лечения состояния, отличающегося гиперчувствительностью в отношении аллергена, находящегося в композиции, содержащей Ara h 1 и/или Ara h 2,

10 причем композиция содержит по меньшей мере пять участков Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2 из перечня, состоящего из:

(i) FQNLQNHR (SEQ ID NO:1);

(ii) IVQIEA (SEQ ID NO:2);

(iii) NEGVIVKVXK (SEQ ID NO:3);

15 (iv) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4);

(v) EGALML (SEQ ID NO:5);

(vi) IMPAАНP (SEQ ID NO:6);

(vii) LRPXEQHLM (SEQ ID NO:7); и

(viii) ENNQRXMXEA (SEQ ID NO:8),

20 где остаток X представляет собой цистеин или серин, и

указанная композиция содержит по меньшей мере один участок эпитопа, выбранный из SEQ ID NO:1-6, и по меньшей мере один участок эпитопа, выбранный из SEQ ID NO: 7-8,

и один или более фармацевтически приемлемых носителей и/или разбавителей.

25 2. Композиция по п.1, где участок эпитопа LRPXEQHLM представляет собой LRPSEQHLM (SEQ ID NO:137).

3. Композиция по п.1 или 2, где участок эпитопа ENNQRXMXEA представляет собой ENNQSRMSEA (SEQ ID NO:138).

4. Композиция по п.1 или 2, где указанная композиция содержит по меньшей мере 6 30 указанных участков эпитопа.

5. Композиция по п.1 или 2, где указанная композиция содержит по меньшей мере 7 участков эпитопа.

6. Композиция по п.1 или 2, где указанная композиция содержит каждый из указанных 8 участков эпитопа.

7. Композиция по п.1 или 2, где указанная композиция содержит один или несколько 35 пептидов, каждый из этих пептидов имеет длину до 60 смежных аминокислот, и эти пептиды содержат один или несколько участков Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2, определенных в SEQ ID NO:1-8.

8. Композиция по п.1 или 2, где указанная композиция содержит Т-клеточные пептиды 40 Ara h 1 и Ara h 2, выбранные из перечня, состоящего из:

(i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11);

(ii) STRSSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:12);

(iii) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4);

(iv) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13);

45 (v) VFIMPAАНPVAINASS (SEQ ID NO:14);

(vi) ANLRPXEQHLM (SEQ ID NO:15);

(vii) EFENNQRXMXEALQ (SEQ ID NO:16);

(viii) NNFGKLFVКPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:17);

- (ix) GDVFIMPAAHPVAINASSE (SEQ ID NO:18);
 - (x) SQLERANLRPXEQHLM (SEQ ID NO:19);
 - (xi) ELNEFENNQRXMXEALQ (SEQ ID NO:20);
 - (xii) FQNLQNHRIV (SEQ ID NO:21);
 - 5 (xiii) RIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:22);
 - (xiv) ENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:23);
 - (xv) EVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:24);
 - (xvi) EFENNQRXMXEALQQI (SEQ ID NO:25);
 - (xvii) NNFGKLFEVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:26);
 - 10 (xviii) ELNEFENNQRXMXEALQQI (SEQ ID NO:27);
 - (xx) WSTRSSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:28); и
 - (xxi) GDVFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:29),
- где остаток X представляет собой цистеин или серин.

9. Композиция по п.8, где указанный остаток X представляет собой серин.

15 10. Композиция по п.8, где указанная композиция содержит Т-клеточные пептиды Ara h 1 и Ara h 2, выбранные из перечня, состоящего из:

- (i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11);
- (ii) STRSSENNEGVIVKVSKE (SEQ ID NO:12);
- (iii) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4);
- 20 (iv) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13);
- (v) VFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:14);
- (vi) ANLRPSEQHLM (SEQ ID NO:31);
- (vii) EFENNQRSMSEALQ (SEQ ID NO:32);
- (viii) EVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:24); и
- 25 (ix) EFENNQRSMSEALQQI (SEQ ID NO:33).

11. Композиция по п.1 или 2, где указанная композиция дополнительно содержит один или несколько пептидов, выбранных из перечня, состоящего из:

- (i) ALMLPHFNSKAMVIVVV (SEQ ID NO:34);
- (ii) NNFGKLFEVKPDKKNPQ (SEQ ID NO:35);
- 30 (iii) SQLERANLRPXEQ (SEQ ID NO:36);
- (iv) ELNEFENNQRXM (SEQ ID NO:37);
- (v) NNFGKLFEVKPDKKNPQLQD (SEQ ID NO:38);
- (vi) NNFGKLFEVKPDKKNPQL (SEQ ID NO:40);
- (vii) SQLERANLRPXEQH (SEQ ID NO:41);
- 35 (viii) KAMVIVVVNKG TGNLELVAV (SEQ ID NO:42);
- (ix) KAMVIVVVNKG (SEQ ID NO:44);
- (x) AMVIVVVNKG TGNLELV (SEQ ID NO:45); и
- (xi) VVNKG TGNLELVAVRK (SEQ ID NO:46),

где остаток X представляет собой цистеин или серин.

40 12. Композиция по п.10, где указанная композиция содержит каждый из Т-клеточных пептидов Ara h 1 и Ara h 2, выбранных из перечня, состоящего из:

- (i) FQNLQNHRIVQIEAKPNTLV (SEQ ID NO:11);
- (ii) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4);
- (iii) VEIKEGALMLPHFNSKA (SEQ ID NO:13);
- 45 (iv) VFIMPAAHPVAINASS (SEQ ID NO:14);
- (v) ANLRPSEQHLM (SEQ ID NO:31);
- (vi) EFENNQRSMSEALQ (SEQ ID NO:32); и
- (vii) RELRNLPQQXGLRA (SEQ ID NO:43),

где остаток X представляет собой цистеин или серин.

13. Композиция по п.1 или 2, где указанные пептиды способны уменьшать гиперчувствительность к Ara h 1 и/или Ara h 2 или гиперчувствительность к композиции, содержащей Ara h 1 и/или Ara h 2, при введении субъекту с состоянием,

5 характеризующимся указанной гиперчувствительностью.

14. Композиция для лечения или профилактики состояния, отличающегося гиперчувствительностью к молекулам Ara h 1 и/или Ara h 2,

причем композиция содержит одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере пять участков Т-клеточных эпитопов Ara h 1 и Ara h 2

10 из перечня, состоящего из:

(i) FQNLQNHHR (SEQ ID NO:1);

(ii) IVQIEA (SEQ ID NO:2);

(iii) NEGVIVKVXK (SEQ ID NO:3);

(iv) EVKPDKKNPQLQ (SEQ ID NO:4);

15 (v) EGALML (SEQ ID NO:5);

(vi) IMPAАНP (SEQ ID NO:6);

(vii) LRPXEQHLM (SEQ ID NO:7); и

(viii) ENNQRXMXEA (SEQ ID NO:8),

где остаток X представляет собой цистеин или серин, и

20 указанные молекулы нуклеиновых кислот кодируют по меньшей мере один участок эпитопа, выбранный из SEQ ID NO:1-6, и по меньшей мере один участок эпитопа, выбранный из SEQ ID NO:7-8, и

один или более фармацевтически приемлемых носителей и/или разбавителей.

15. Композиция по п.14, где одна или несколько молекул нуклеиновых кислот

25 кодируют эпитопы и пептиды по любому из пп.2-11.

16. Способ лечения или профилактики состояния, отличающегося гиперчувствительностью в отношении молекул Ara h 1 и/или Ara h 2,

при этом указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества иммуномодулирующей композиции по любому из пп.1-15 в течение периода

30 времени и при условиях, достаточных для устранения или уменьшения присутствия или функционирования у указанного субъекта Т-клеток, направленных против указанного Ara h 1 и/или Ara h 2.

17. Способ по п.16, где состояние представляет собой гиперчувствительность к разновидностям арахиса или древесным орехам, которые содержат молекулы Ara h 1

35 и Ara h 2.

18. Способ по п.17, где указанные орехи представляют собой разновидности лещины, разновидности миндаля или разновидности бразильского ореха.

19. Способ по п.16, где указанный способ обеспечивает десенсибилизацию или индуцирует иммунологическую толерантность к Ara h 1 и/или Ara h 2.

40 20. Способ по п.19, где указанную десенсибилизацию или толерантность обеспечивают путем индукции анергии или апоптоза Т-клеток.

21. Способ по п.19 или 20, где указанную десенсибилизацию или толерантность обеспечивают путем индукции Treg клеток, специфичных в отношении Ara h 1 или Ara h 2.

45 22. Способ по п.16, где указанную композицию вводят интрадермально или трансдермально.

23. Способ по п.16, где указанный субъект является человеком.

24. Применение иммуномодулирующей композиции по любому из пп.1-15 для

получения лекарственного препарата для лечения состояния у млекопитающего, причем это состояние отличается гиперчувствительностью в отношении молекул Ara h 1 и/или Ara h 2.

25. Применение по п.24, где состояние представляет собой гиперчувствительность к разновидностям арахиса или древесным орехам, которые содержат молекулы Ara h 1 и Ara h 2.

26. Применение по п.24, где указанный способ обеспечивает десенсибилизацию или индуцирует иммунологическую толерантность к Ara h 1 и/или Ara h 2.

10

15

20

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> МОНАШ ЮНИВЕРСИТИ
 АЛФРЕД ХЕЛС

<120> НОВАЯ ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> P38407PCAU

<150> AU 2013903686
 <151> 2013-09-25

<160> 143

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1
 <211> 8
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 1

<400> 1

Phe Gln Asn Leu Gln Asn His Arg
 1 5

<210> 2
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 1

<400> 2

Ile Val Gln Ile Glu Ala
 1 5

<210> 3
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 1

<400> 3

Asn Glu Gly Val Ile Val Lys Val Ser Lys
 1 5 10

<210> 4
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 1

<400> 4

Glu Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro Gln Leu Gln
 1 5 10

<210> 5
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 1

<400> 5

Glu Gly Ala Leu Met Leu
1 5

<210> 6

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 6

Ile Met Pro Ala Ala His Pro
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (4) .. (4)

<223> X представляет собой цистеин или серин

<400> 7

Leu Arg Pro Xaa Glu Gln His Leu Met
1 5

<210> 8

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 2

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (6) .. (6)

<223> X представляет собой цистеин или серин

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (8) .. (8)

<223> X представляет собой цистеин или серин

<400> 8

Glu Asn Asn Gln Arg Xaa Met Xaa Glu Ala
1 5 10

<210> 9

<211> 626

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1 арахиса

<400> 9

Met 1	Arg	Gly	Arg	Val 5	Ser	Pro	Leu	Met	Leu 10	Leu	Leu	Gly	Ile	Leu 15	Val
Leu	Ala	Ser	Val 20	Ser	Ala	Thr	His	Ala 25	Lys	Ser	Ser	Pro	Tyr 30	Gln	Lys
Lys	Thr	Glu 35	Asn	Pro	Cys	Ala	Gln 40	Arg	Cys	Leu	Gln	Ser 45	Cys	Gln	Gln
Glu	Pro 50	Asp	Asp	Leu	Lys	Gln 55	Lys	Ala	Cys	Glu	Ser 60	Arg	Cys	Thr	Lys
Leu 65	Glu	Tyr	Asp	Pro	Arg	Cys 70	Val	Tyr	Asp	Pro 75	Arg	Gly	His	Thr	Gly 80
Thr	Thr	Asn	Gln	Arg 85	Ser	Pro	Pro	Gly	Glu 90	Arg	Thr	Arg	Gly	Arg 95	Gln
Pro	Gly	Asp	Tyr 100	Asp	Asp	Asp	Arg	Arg	Gln 105	Pro	Arg	Arg	Glu 110	Glu	Gly
Gly	Arg	Trp 115	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro 120	Arg	Glu	Arg	Glu	Arg 125	Glu	Glu	Asp
Trp	Arg 130	Gln	Pro	Arg	Glu	Asp 135	Trp	Arg	Arg	Pro	Ser 140	His	Gln	Gln	Pro
Arg 145	Lys	Ile	Arg	Pro	Glu 150	Gly	Arg	Glu	Gly	Glu 155	Gln	Glu	Trp	Gly	Thr 160
Pro	Gly	Ser	His	Val 165	Arg	Glu	Glu	Thr	Ser 170	Arg	Asn	Asn	Pro	Phe	Tyr
Phe	Pro	Ser	Arg 180	Arg	Phe	Ser	Thr	Arg 185	Tyr	Gly	Asn	Gln	Asn 190	Gly	Arg
Ile	Arg 195	Val	Leu	Gln	Arg	Phe	Asp 200	Gln	Arg	Ser	Arg	Gln 205	Phe	Gln	Asn
Leu 210	Gln	Asn	His	Arg	Ile	Val 215	Gln	Ile	Glu	Ala	Lys 220	Pro	Asn	Thr	Leu
Val 225	Leu	Pro	Lys	His	Ala 230	Asp	Ala	Asp	Asn	Ile 235	Leu	Val	Ile	Gln	Gln 240
Gly	Gln	Ala	Thr 245	Val	Thr	Val	Ala	Asn	Gly 250	Asn	Asn	Arg	Lys	Ser 255	Phe

Asn Leu Asp Glu Gly His Ala Leu Arg Ile Pro Ser Gly Phe Ile Ser
 260 265 270
 Tyr Ile Leu Asn Arg His Asp Asn Gln Asn Leu Arg Val Ala Lys Ile
 275 280 285
 Ser Met Pro Val Asn Thr Pro Gly Gln Phe Glu Asp Phe Phe Pro Ala
 290 295 300
 Ser Ser Arg Asp Gln Ser Ser Tyr Leu Gln Gly Phe Ser Arg Asn Thr
 305 310 315 320
 Leu Glu Ala Ala Phe Asn Ala Glu Phe Asn Glu Ile Arg Arg Val Leu
 325 330 335
 Leu Glu Glu Asn Ala Gly Gly Glu Gln Glu Glu Arg Gly Gln Arg Arg
 340 345 350
 Trp Ser Thr Arg Ser Ser Glu Asn Asn Glu Gly Val Ile Val Lys Val
 355 360 365
 Ser Lys Glu His Val Glu Glu Leu Thr Lys His Ala Lys Ser Val Ser
 370 375 380
 Lys Lys Gly Ser Glu Glu Glu Gly Asp Ile Thr Asn Pro Ile Asn Leu
 385 390 395 400
 Arg Glu Gly Glu Pro Asp Leu Ser Asn Asn Phe Gly Lys Leu Phe Glu
 405 410 415
 Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro Gln Leu Gln Asp Leu Asp Met Met
 420 425 430
 Leu Thr Cys Val Glu Ile Lys Glu Gly Ala Leu Met Leu Pro His Phe
 435 440 445
 Asn Ser Lys Ala Met Val Ile Val Val Val Asn Lys Gly Thr Gly Asn
 450 455 460
 Leu Glu Leu Val Ala Val Arg Lys Glu Gln Gln Gln Arg Gly Arg Arg
 465 470 475 480
 Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Glu Gly Ser Asn Arg Glu
 485 490 495
 Val Arg Arg Tyr Thr Ala Arg Leu Lys Glu Gly Asp Val Phe Ile Met
 500 505 510

Pro Ala Ala His Pro Val Ala Ile Asn Ala Ser Ser Glu Leu His Leu
515 520 525

Leu Gly Phe Gly Ile Asn Ala Glu Asn Asn His Arg Ile Phe Leu Ala
530 535 540

Gly Asp Lys Asp Asn Val Ile Asp Gln Ile Glu Lys Gln Ala Lys Asp
545 550 555 560

Leu Ala Phe Pro Gly Ser Gly Glu Gln Val Glu Lys Leu Ile Lys Asn
565 570 575

Gln Lys Glu Ser His Phe Val Ser Ala Arg Pro Gln Ser Gln Ser Gln
580 585 590

Ser Pro Ser Ser Pro Glu Lys Glu Ser Pro Glu Lys Glu Asp Gln Glu
595 600 605

Glu Glu Asn Gln Gly Gly Lys Gly Pro Leu Leu Ser Ile Leu Lys Ala
610 615 620

Phe Asn
625

<210> 10
<211> 157
<212> БЕЛОК
<213> Арахис

<400> 10

Leu Thr Ile Leu Val Ala Leu Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ala His Ala
1 5 10 15

Ser Ala Arg Gln Gln Trp Glu Leu Gln Gly Asp Arg Arg Cys Gln Ser
20 25 30

Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu Gln His Leu Met Gln
35 40 45

Lys Ile Gln Arg Asp Glu Asp Ser Tyr Glu Arg Asp Pro Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Gln Asp Pro Tyr Ser Pro Ser Pro Tyr Asp Arg Arg Gly Ala Gly
65 70 75 80

Ser Ser Gln His Gln Glu Arg Cys Cys Asn Glu Leu Asn Glu Phe Glu
85 90 95

Asn Asn Gln Arg Cys Met Cys Glu Ala Leu Gln Gln Ile Met Glu Asn

6

100 105 110

Gln Ser Asp Arg Leu Gln Gly Arg Gln Gln Glu Gln Gln Phe Lys Arg
115 120 125

Glu Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu Arg Ala Pro Gln Arg
130 135 140

Cys Asp Leu Asp Val Glu Ser Gly Gly Arg Asp Arg Tyr
145 150 155

<210> 11
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 1

<400> 11

Phe Gln Asn Leu Gln Asn His Arg Ile Val Gln Ile Glu Ala Lys Pro
1 5 10 15

Asn Thr Leu Val
20

<210> 12
<211> 18
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 1

<400> 12

Ser Thr Arg Ser Ser Glu Asn Asn Glu Gly Val Ile Val Lys Val Ser
1 5 10 15

Lys Glu

<210> 13
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 1

<400> 13

Val Glu Ile Lys Glu Gly Ala Leu Met Leu Pro His Phe Asn Ser Lys
1 5 10 15

Ala

<210> 14
<211> 16
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 1

<400> 14

Val Phe Ile Met Pro Ala Ala His Pro Val Ala Ile Asn Ala Ser Ser
1 5 10 15

<210> 15

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 2

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (6)..(6)

<223> X представляет собой цистеин или серин

<400> 15

Ala Asn Leu Arg Pro Xaa Glu Gln His Leu Met
1 5 10

<210> 16

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 2

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (8)..(8)

<223> X представляет собой цистеин или серин

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (10)..(10)

<223> X представляет собой цистеин или серин

<400> 16

Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Xaa Met Xaa Glu Ala Leu Gln
1 5 10

<210> 17

<211> 19

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 17

Asn Asn Phe Gly Lys Leu Phe Glu Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro
1 5 10 15

Gln Leu Gln

<210> 18

<211> 19

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 18

Gly Asp Val Phe Ile Met Pro Ala Ala His Pro Val Ala Ile Asn Ala
1 5 10 15

Ser Ser Glu

<210> 19

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 2

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (11)..(11)

<223> X представляет собой цистеин или серин

<400> 19

Ser Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Xaa Glu Gln His Leu Met
1 5 10 15

<210> 20

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 2

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (11)..(11)

<223> X представляет собой цистеин или серин

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (13)..(13)

<223> X представляет собой цистеин или серин

<400> 20

Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Xaa Met Xaa Glu Ala Leu
1 5 10 15

Gln

<210> 21

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 21

Phe Gln Asn Leu Gln Asn His Arg Ile Val
1 5 10

9

<210> 22
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 1

<400> 22

Arg Ile Val Gln Ile Glu Ala Lys Pro Asn Thr Leu Val
 1 5 10

<210> 23
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 1

<400> 23

Glu Asn Asn Glu Gly Val Ile Val Lys Val Ser Lys Glu
 1 5 10

<210> 24
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 1

<400> 24

Glu Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro Gln Leu Gln Asp
 1 5 10

<210> 25
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 2

<220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (8)..(8)
 <223> X представляет собой цистеин или серин

<220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (10)..(10)
 <223> X представляет собой цистеин или серин

<400> 25

Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Xaa Met Xaa Glu Ala Leu Gln Gln Ile
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 20
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 1

<400> 26

10

Asn Asn Phe Gly Lys Leu Phe Glu Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro
1 5 10 15

Gln Leu Gln Asp
20

<210> 27
<211> 19
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (11)..(11)
<223> X представляет собой цистеин или серин

<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (13)..(13)
<223> X представляет собой цистеин или серин

<400> 27

Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Xaa Met Xaa Glu Ala Leu
1 5 10 15

Gln Gln Ile

<210> 28
<211> 19
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 1

<400> 28

Trp Ser Thr Arg Ser Ser Glu Asn Asn Glu Gly Val Ile Val Val Lys
1 5 10 15

Ser Lys Glu

<210> 29
<211> 18
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 1

<400> 29

Gly Asp Val Phe Ile Met Pro Ala Ala His Pro Val Ala Ile Asn Ala
1 5 10 15

Ser Ser

11

<210> 30
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 1

<400> 30

Ser Thr Arg Ser Ser Glu Asn Asn Glu Gly Val Ile Val Lys Val Ser
 1 5 10 15

Lys Glu

<210> 31
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 2

<400> 31

Ala Asn Leu Arg Pro Ser Glu Gln His Leu Met
 1 5 10

<210> 32
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 2

<400> 32

Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Ser Met Ser Glu Ala Leu Gln
 1 5 10

<210> 33
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 2

<400> 33

Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Ser Met Ser Glu Ala Leu Gln Gln Ile
 1 5 10 15

<210> 34
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Ara h 1

<400> 34

Ala Leu Met Leu Pro His Phe Asn Ser Lys Ala Met Val Ile Val Val
 1 5 10 15

Val

<210> 35

12

<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 1

<400> 35

Asn Asn Phe Gly Lys Leu Phe Glu Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro
1 5 10 15

Gln

<210> 36
<211> 13
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> {11}..{11}
<223> X представляет собой цистеин или серин

<400> 36

Ser Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Xaa Glu Gln
1 5 10

<210> 37
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> {11}..{11}
<223> X представляет собой цистеин или серин

<400> 37

Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Xaa Met
1 5 10

<210> 38
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 1

<400> 38

Asn Asn Phe Gly Lys Leu Phe Glu Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro
1 5 10 15

Gln Leu Gln Asp
20

<210> 39

13

<211> 19
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 39

Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Ser Met Ser Glu Ala Leu
1 5 10 15

Gln Gln Ile

<210> 40
<211> 18
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 1

<400> 40

Asn Asn Phe Gly Lys Leu Phe Glu Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro
1 5 10 15

Gln Leu

<210> 41
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (11)..(11)
<223> X представляет собой цистеин или серин

<400> 41

Ser Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Xaa Glu Gln His
1 5 10

<210> 42
<211> 21
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 1

<400> 42

Lys Ala Met Val Ile Val Val Val Asn Lys Gly Thr Gly Asn Leu Glu
1 5 10 15

Leu Val Ala Val Asp
20

<210> 43
<211> 14
<212> БЕЛОК

14

<213> Ara h 2

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (10)..(10)

<223> X представляет собой цистеин или серин

<400> 43

Arg	Glu	Leu	Arg	Asn	Leu	Pro	Gln	Gln	Xaa	Gly	Leu	Arg	Ala
1				5					10				

<210> 44

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 44

Lys	Ala	Met	Val	Ile	Val	Val	Val	Asn	Lys	Gly
1				5					10	

<210> 45

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 45

Ala	Met	Val	Ile	Val	Val	Val	Asn	Lys	Gly	Thr	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu
1				5					10					15	

Val

<210> 46

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 46

Val	Val	Asn	Lys	Gly	Thr	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Val	Ala	Val	Arg	Lys
1				5					10					15	

<210> 47

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 47

Phe	Asp	Gln	Arg	Ser	Arg	Gln	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Asn	His	Arg	Ile
1				5					10					15	

Val	Gln	Ile	Glu
			20

15

<210> 48
 <211> 20
 <212> БЕЖОК
 <213> Ara h 1

<400> 48

Asn Leu Gln Asn His Arg Ile Val Gln Ile Glu Ala Lys Pro Asn Thr
 1 5 10 15

Leu Val Leu Pro
 20

<210> 49
 <211> 20
 <212> БЕЖОК
 <213> Ara h 1

<400> 49

Arg Trp Ser Thr Arg Ser Ser Glu Asn Asn Glu Gly Val Ile Val Lys
 1 5 10 15

Val Ser Lys Glu
 20

<210> 50
 <211> 20
 <212> БЕЖОК
 <213> Ara h 1

<400> 50

Asp Leu Ser Asn Asn Phe Gly Lys Leu Phe Glu Val Lys Pro Asp Lys
 1 5 10 15

Lys Asn Pro Gln
 20

<210> 51
 <211> 20
 <212> БЕЖОК
 <213> Ara h 1

<400> 51

Phe Glu Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro Gln Leu Gln Asp Leu Asp
 1 5 10 15

Met Met Leu Thr
 20

<210> 52
 <211> 20

16

<212> БЕЖОК
 <213> Ara h 1

 <400> 52

 Leu Thr Cys Val Glu Ile Lys Glu Gly Ala Leu Met Leu Pro His Phe
 1 5 10 15

 Asn Ser Lys Ala
 20

 <210> 53
 <211> 20
 <212> БЕЖОК
 <213> Ara h 1

 <400> 53

 Ala Leu Met Leu Pro His Phe Asn Ser Lys Ala Met Val Ile Val Val
 1 5 10 15

 Val Asn Lys Gly
 20

 <210> 54
 <211> 21
 <212> БЕЖОК
 <213> Ara h 1

 <400> 54

 Lys Ala Met Val Ile Val Val Val Asn Lys Gly Thr Gly Asn Leu Glu
 1 5 10 15

 Leu Val Ala Val Ala
 20

 <210> 55
 <211> 20
 <212> БЕЖОК
 <213> Ara h 1

 <400> 55

 Lys Glu Gly Asp Val Phe Ile Met Pro Ala Ala His Pro Val Ala Ile
 1 5 10 15

 Asn Ala Ser Ser
 20

 <210> 56
 <211> 20
 <212> БЕЖОК
 <213> Ara h 2

 <400> 56

17

Arg Arg Cys Gln Ser Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu
1 5 10 15

Gln His Leu Met
20

<210> 57
<211> 20
<212> БЕЖОК
<213> Ara h 2

<400> 57

Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu Gln His Leu Met Gln Lys Ile Gln Arg
1 5 10 15

Asp Glu Asp Ser
20

<210> 58
<211> 20
<212> БЕЖОК
<213> Ara h 2

<400> 58

Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Cys Met Cys Glu Ala Leu
1 5 10 15

Gln Gln Ile Met
20

<210> 59
<211> 20
<212> БЕЖОК
<213> Ara h 2

<400> 59

Lys Arg Glu Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu Arg Ala Pro
1 5 10 15

Gln Arg Cys Asp
20

<210> 60
<211> 8
<212> БЕЖОК
<213> Ara h 1

<400> 60

Phe Gln Asn Leu Gln Asn His Arg
1 5

18

<210> 61
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 1

<400> 61

Phe Gln Asn Leu Gln Asn His Arg Ile Val
 1 5 10

<210> 62
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 1

<400> 62

Arg Ile Val Gln Ile Glu Ala Lys Pro Asn
 1 5 10

<210> 63
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 1

<400> 63

Arg Ile Val Gln Ile Glu Ala Lys Pro Asn Thr Leu Val
 1 5 10

<210> 64
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 1

<400> 64

Ile Val Gln Ile Glu Ala
 1 5

<210> 65
 <211> 19
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 1

<400> 65

Trp Ser Thr Arg Ser Ser Glu Asn Asn Glu Gly Val Ile Val Lys Val
 1 5 10 15

Ser Lys Glu

<210> 66
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 1

19

<400> 66

Glu Asn Asn Glu Gly Val Ile Val Lys Val Ser Lys Glu Ala
1 5 10

<210> 67

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 67

Asn Glu Gly Val Ile Val Lys Val Ser Lys
1 5 10

<210> 68

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 68

Asn Asn Phe Gly Lys Leu Phe Glu Val Lys
1 5 10

<210> 69

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 69

Asn Asn Phe Gly Lys Leu Phe Glu Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro
1 5 10 15

Gln

<210> 70

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 70

Phe Gly Lys Leu Phe Glu Val Lys
1 5

<210> 71

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 71

Glu Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro Gln Leu Gln
1 5 10

20

<210> 72
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Ара h 1

<400> 72

Val Glu Ile Lys Glu Gly Ala Leu Met Leu
1 5 10

<210> 73
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Ара h 1

<400> 73

Val Glu Ile Lys Glu Gly Ala Leu Met Leu Pro His Phe Asn
1 5 10

<210> 74
<211> 13
<212> БЕЛОК
<213> Ара h 1

<400> 74

Glu Gly Ala Leu Met Leu Pro His Phe Asn Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 75
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Ара h 1

<400> 75

Ala Leu Met Leu Pro His Phe Asn Ser Lys Ala Met Val Ile Val Val
1 5 10 15

Val

<210> 76
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Ара h 1

<400> 76

Leu Met Leu Pro His Phe Asn Ser Lys Ala Met Val Ile Val Val
1 5 10 15

<210> 77
<211> 11
<212> БЕЛОК

21

<213> Ara h 1

<400> 77

Pro His Phe Asn Ser Lys Ala Met Val Ile Val
1 5 10

<210> 78

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 78

Lys Ala Met Val Ile Val Val Val Asn
1 5

<210> 79

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 79

Ala Met Val Ile Val Val Val Asn Lys Gly
1 5 10

<210> 80

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 80

Ile Val Val Val Asn Lys Gly
1 5

<210> 81

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 81

Ala Met Val Ile Val Val Val Asn Lys Gly Thr Gly Asn Leu Glu Leu
1 5 10 15

<210> 82

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 1

<400> 82

Ala Met Val Ile Val Val Val Asn Lys Gly Thr Gly Asn Leu Glu Leu
1 5 10 15

Val

<210> 83
 <211> 13
 <212> БЕЖОК
 <213> Ara h 1

<400> 83

Val Val Asn Lys Gly Thr Gly Asn Leu Glu Leu Val Ala
 1 5 10

<210> 84
 <211> 14
 <212> БЕЖОК
 <213> Ara h 1

<400> 84

Val Val Asn Lys Gly Thr Gly Asn Leu Glu Leu Val Ala Val
 1 5 10

<210> 85
 <211> 17
 <212> БЕЖОК
 <213> Ara h 1

<400> 85

Val Glu Ile Lys Gly Ala Leu Met Leu Pro His Phe Asn Ser Lys
 1 5 10 15

Ala

<210> 86
 <211> 11
 <212> БЕЖОК
 <213> Ara h 1

<400> 86

Lys Ala Met Val Ile Val Val Val Asn Lys Gly
 1 5 10

<210> 87
 <211> 19
 <212> БЕЖОК
 <213> Ara h 1

<400> 87

Ala Met Val Ile Val Val Val Asn Lys Gly Thr Gly Asn Leu Glu Leu
 1 5 10 15

Val Ala Val

23

<210> 88
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 1

<400> 88

Gly Asp Val Phe Ile Met Pro Ala Ala His Pro Val Ala Ile Asn Ala
 1 5 10 15

Ser Ser

<210> 89
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 1

<400> 89

Val Phe Ile Met Pro Ala Ala His Pro Val Ala Ile Asn Ala Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 90
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 1

<400> 90

Phe Ile Met Pro Ala Ala His Pro Val Ala Ile Asn
 1 5 10

<210> 91
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 1

<400> 91

Ile Met Pro Ala Ala His Pro
 1 5

<210> 92
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 1

<400> 92

Ile Met Pro Ala Ala His Pro Val Ala Ile Asn
 1 5 10

<210> 93
 <211> 20
 <212> БЕЛОК

24

<213> Ara h 2

<400> 93

Arg Arg Cys Gln Ser Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu
1 5 10 15

Gln His Leu Met
20

<210> 94

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 2

<400> 94

Ser Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu Gln
1 5 10

<210> 95

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 2

<400> 95

Ser Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys
1 5 10

<210> 96

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 2

<400> 96

Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys
1 5

<210> 97

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 2

<400> 97

Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu Gln
1 5 10

<210> 98

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Ara h 2

<400> 98

Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu Gln

25

1 5 10

<210> 99
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 99

Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu Gln His Leu Met
1 5 10

<210> 100
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 100

Leu Arg Pro Cys Glu Gln His Leu Met
1 5

<210> 101
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 101

Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Cys Met Cys Glu Ala Leu
1 5 10 15

Gln Gln Ile Met
20

<210> 102
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 102

Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Cys Met
1 5 10

<210> 103
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 103

Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Cys Met
1 5 10

<210> 104
<211> 14

26

<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 104

Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Cys Met Cys Glu Ala Leu Gln
1 5 10

<210> 105
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 105

Glu Asn Asn Gln Arg Cys Met Cys Glu Ala
1 5 10

<210> 106
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 106

Asn Asn Gln Arg Cys Met Cys Glu Ala Leu Gln
1 5 10

<210> 107
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 107

Lys Arg Glu Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu Arg Ala Pro
1 5 10 15

Gln Arg Cys Asp
20

<210> 108
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 108

Arg Glu Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu
1 5 10

<210> 109
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 109

27

Glu Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu Arg
1 5 10

<210> 110
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 110

Glu Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu
1 5 10

<210> 111
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 111

Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu
1 5 10

<210> 112
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 112

Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln Cys Gly
1 5

<210> 113
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 113

Arg Glu Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu Arg Ala
1 5 10

<210> 114
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 1

<400> 114

Phe Asp Gln Arg Ser Arg Gln Phe Gln Asn Leu Gln Asn His Arg Ile
1 5 10 15

Val Gln Ile Glu
20

<210> 115

28

<211> 20
<212> БЕЖОК
<213> Ara h 1

<400> 115

Asn Leu Gln Asn His Arg Ile Val Gln Ile Glu Ala Lys Pro Asn Thr
1 5 10 15

Leu Val Leu Pro
20

<210> 116
<211> 20
<212> БЕЖОК
<213> Ara h 1

<400> 116

Asp Leu Ser Asn Asn Phe Gly Lys Leu Phe Glu Val Lys Pro Asp Lys
1 5 10 15

Lys Asn Pro Gln
20

<210> 117
<211> 20
<212> БЕЖОК
<213> Ara h 1

<400> 117

Phe Glu Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro Gln Leu Gln Asp Leu Asp
1 5 10 15

Met Met Leu Thr
20

<210> 118
<211> 20
<212> БЕЖОК
<213> Ara h 1

<400> 118

Leu Thr Cys Val Glu Ile Lys Glu Gly Ala Leu Met Leu Pro His Phe
1 5 10 15

Asn Ser Lys Ala
20

<210> 119
<211> 20
<212> БЕЖОК
<213> Ara h 1

29

<400> 119

Ala Leu Met Leu Pro His Phe Asn Ser Lys Ala Met Val Ile Val Val
1 5 10 15

Val Asn Lys Gly
20

<210> 120

<211> 20

<212> БЕЖОК

<213> Ara h 1

<400> 120

Lys Ala Met Val Ile Val Val Val Asn Lys Gly Thr Gly Asn Leu Glu
1 5 10 15

Leu Val Ala Val
20

<210> 121

<211> 20

<212> БЕЖОК

<213> Ara h 1

<400> 121

Lys Glu Gly Asp Val Phe Ile Met Pro Ala Ala His Pro Val Ala Ile
1 5 10 15

Asn Ala Ser Ser
20

<210> 122

<211> 20

<212> БЕЖОК

<213> Ara h 2

<400> 122

Arg Arg Cys Gln Ser Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu
1 5 10 15

Gln His Leu Met
20

<210> 123

<211> 20

<212> БЕЖОК

<213> Ara h 2

<400> 123

Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Cys Met Cys Glu Ala Leu
1 5 10 15

30

Gln Gln Ile Met
20

<210> 124
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 124

Lys Arg Glu Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu Arg Ala Pro
1 5 10 15

Gln Arg Cys Asp
20

<210> 125
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 125

Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys
1 5

<210> 126
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 126

Leu Arg Pro Cys Glu Gln His Leu Met
1 5

<210> 127
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 127

Phe Glu Asn Asn Gln Arg Cys Met Cys
1 5

<210> 128
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 128

Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Cys
1 5 10

<210> 129
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 2

<400> 129

Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln Cys Gly
 1 5

<210> 130
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 2

<400> 130

Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu Arg Ala
 1 5

<210> 131
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 1

<400> 131

Lys Ala Met Val Ile Val Val Val Asn Lys Gly
 1 5 10

<210> 132
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 1

<400> 132

Val Val Asn Lys Gly Thr Gly Asn Leu Glu Leu Val Ala Val Arg Lys
 1 5 10 15

<210> 133
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 2

<400> 133

Ser Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Ser Glu Gln
 1 5 10

<210> 134
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Ара h 2

<400> 134

Ala Asn Leu Arg Pro Ser Glu Gln His Leu Met

32

1 5 10

<210> 135
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 135

Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Ser Met
1 5 10

<210> 136
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 136

Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Ser Met Ser Glu Ala Leu Gln
1 5 10

<210> 137
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 137

Leu Arg Pro Ser Glu Gln His Leu Met
1 5

<210> 138
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 138

Glu Asn Asn Gln Arg Ser Met Ser Glu Ala
1 5 10

<210> 139
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Ara h 2

<400> 139

Ser Gln His Gln Glu Arg Cys Cys Asn Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn
1 5 10 15

Asn Gln Arg Cys
20

<210> 140
<211> 14

<212> БЕЖОК
<213> Ara h 2

<400> 140

Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Cys Met Cys Glu Ala Leu Gln
1 5 10

<210> 141
<211> 16
<212> БЕЖОК
<213> Ara h 2

<400> 141

Ser Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Ser Glu Gln His Leu Met
1 5 10 15

<210> 142
<211> 17
<212> БЕЖОК
<213> Ara h 2

<400> 142

Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Ser Met Ser Glu Ala Leu
1 5 10 15

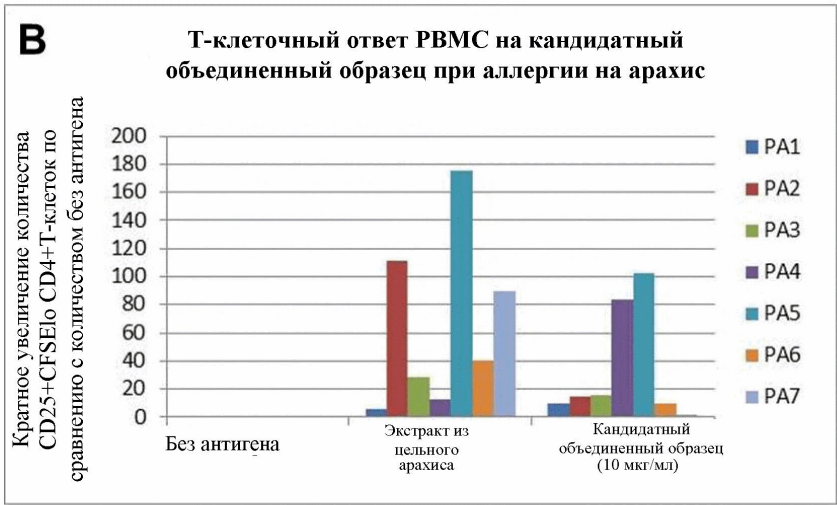
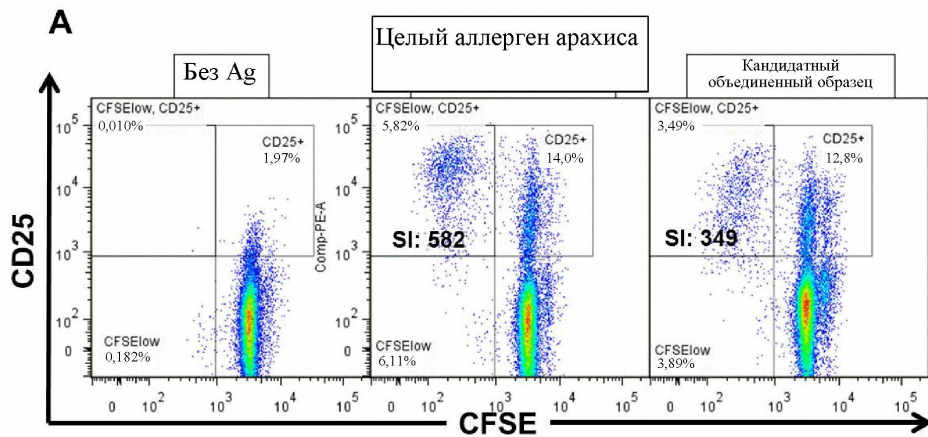
Gln

<210> 143
<211> 13
<212> БЕЖОК
<213> Ara h 2

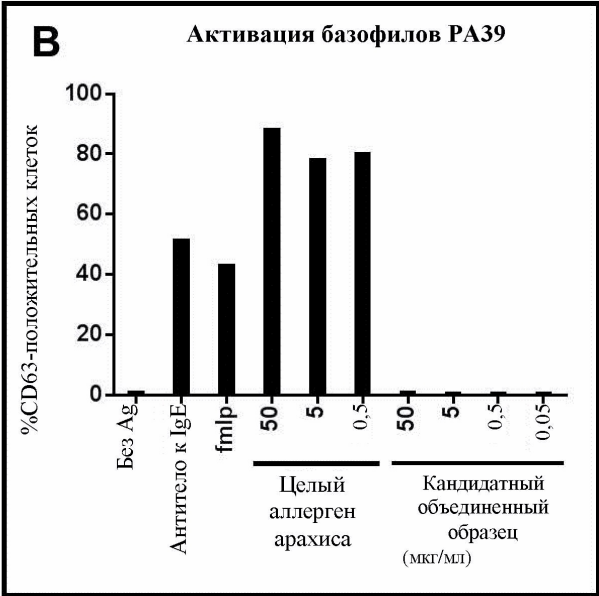
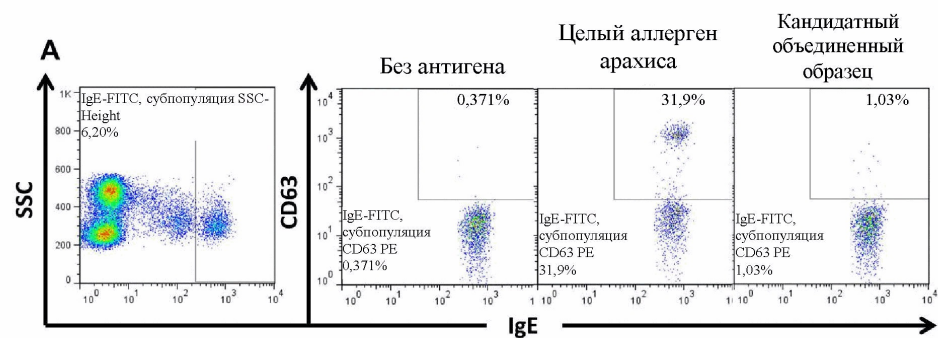
<400> 143

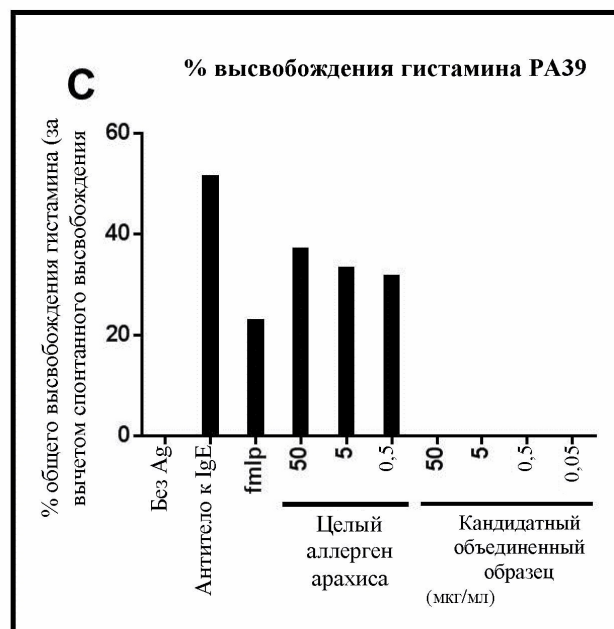
Glu Asn Asn Glu Gly Val Ile Val Lys Val Ser Lys Glu
1 5 10

Фиг. 1



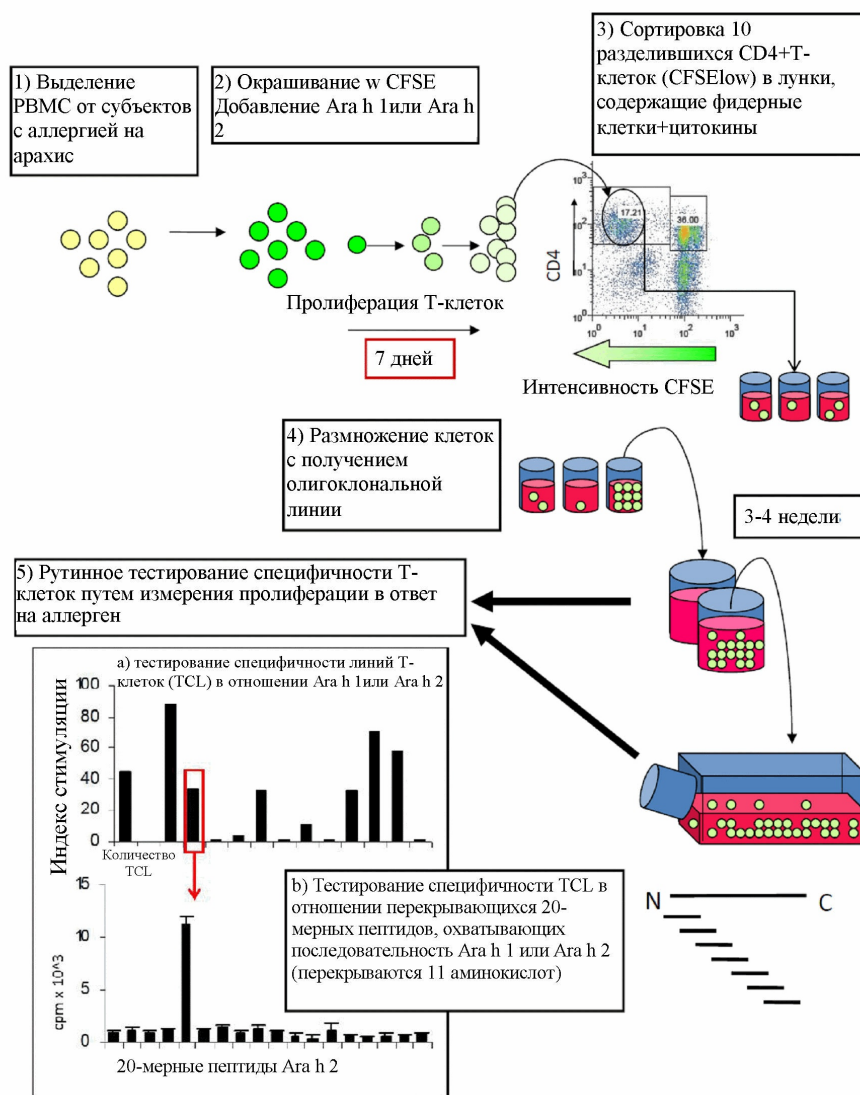
Фиг. 2



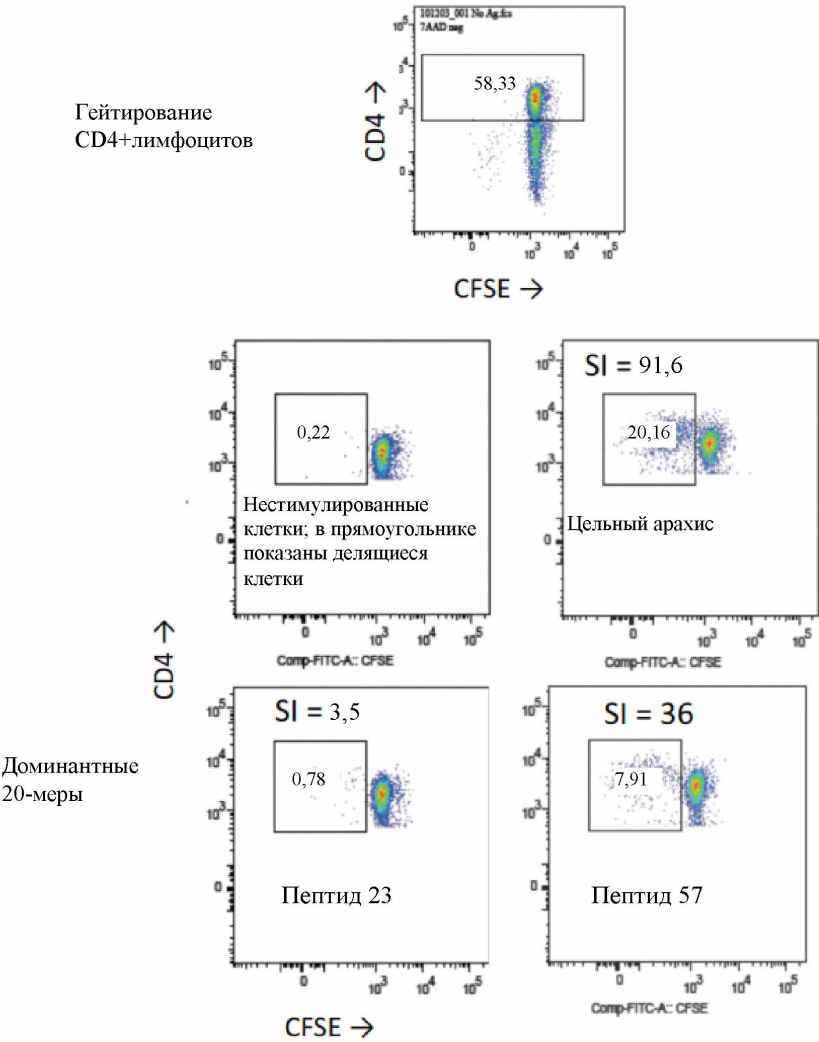


Фиг. 2 (продолжение)

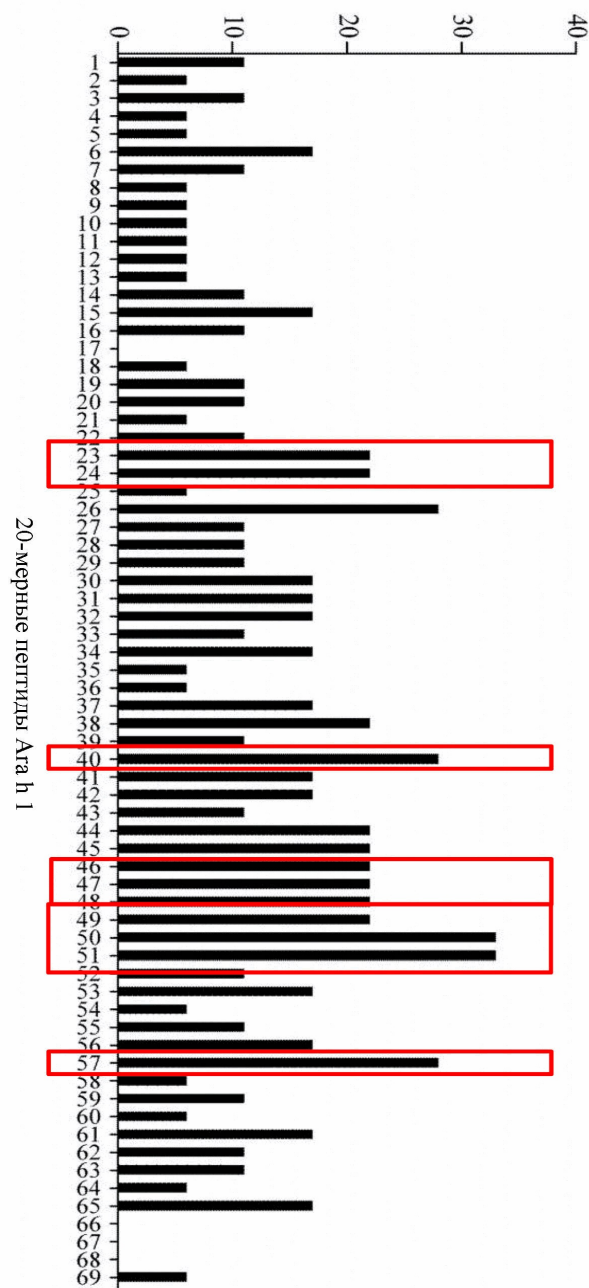
Фиг. 3



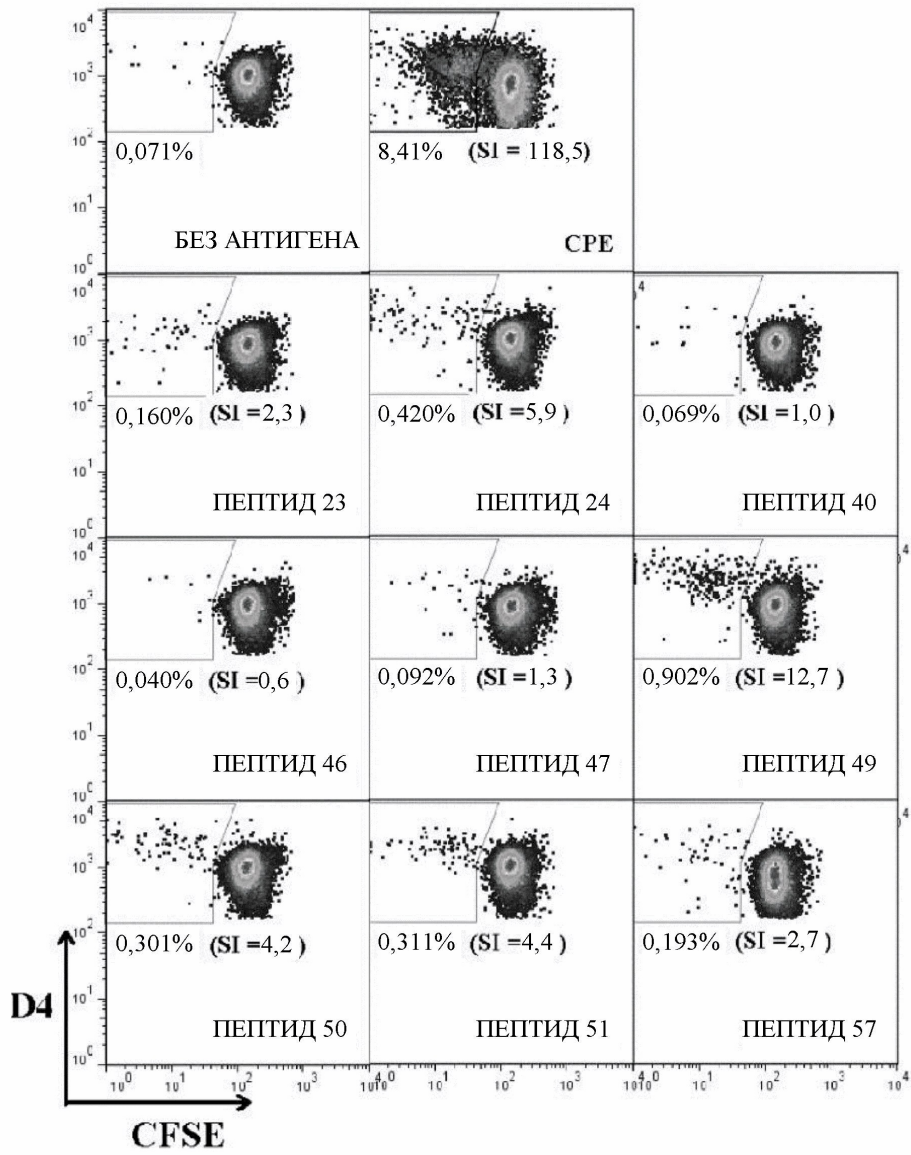
Фиг. 4



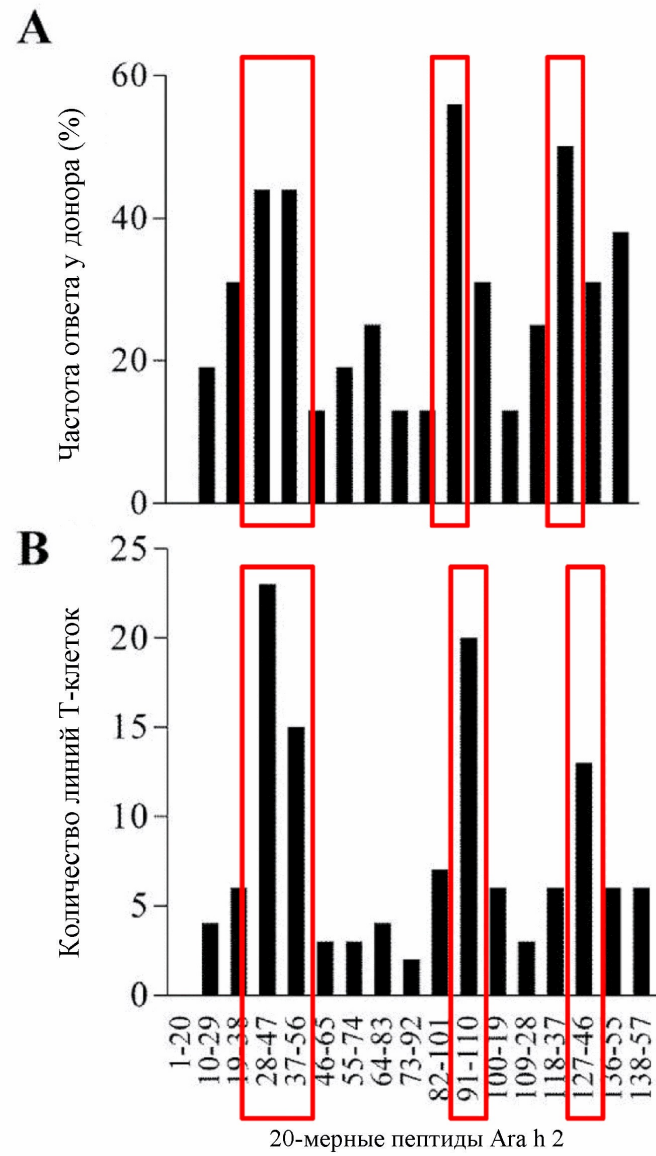
6/15

Фиг. 5**Частота ответа у донора (%)**

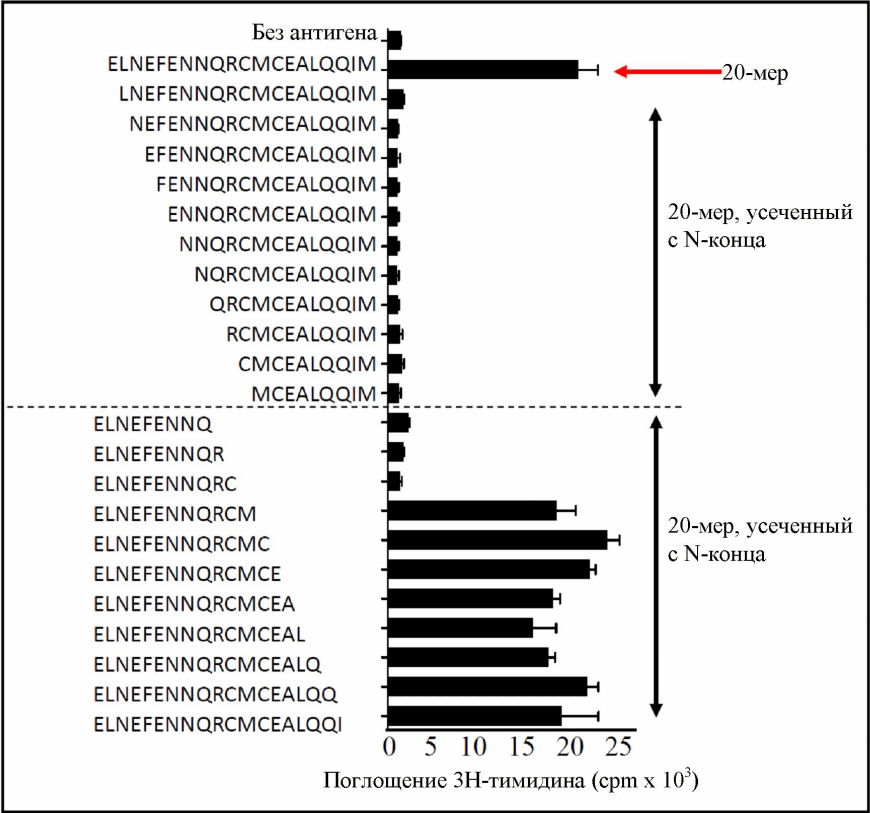
Фиг. 6



Фиг. 7

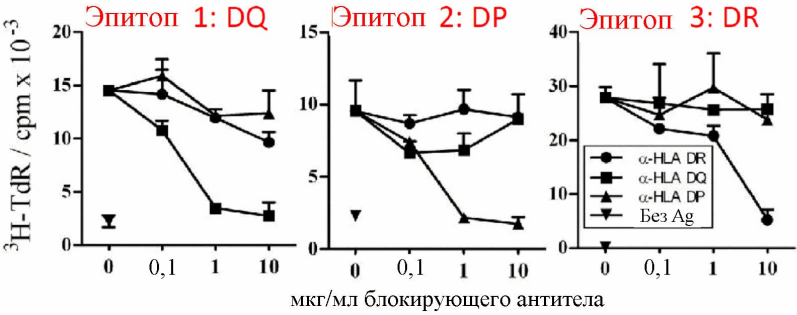


Фиг. 8

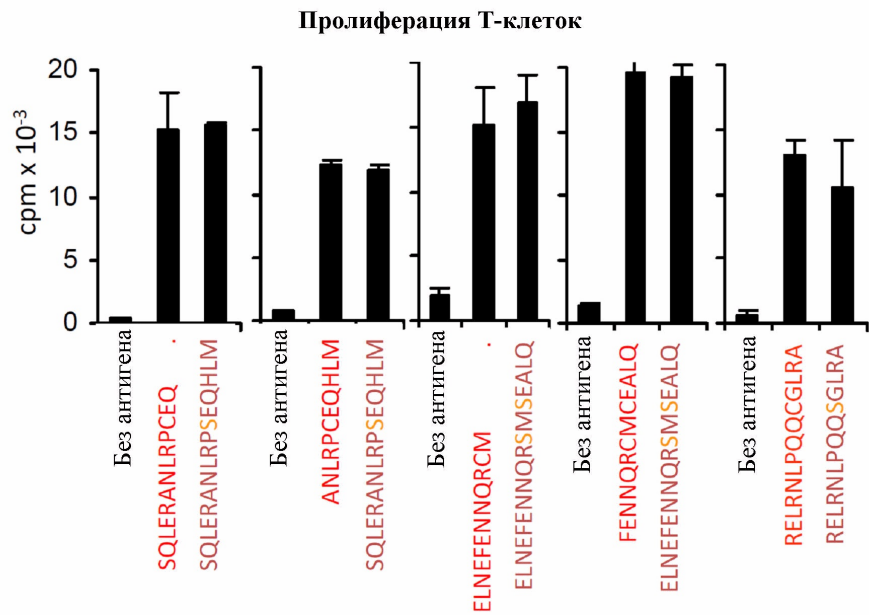


Коровый эпитоп:
ELNEFENNQRCEALQQIM

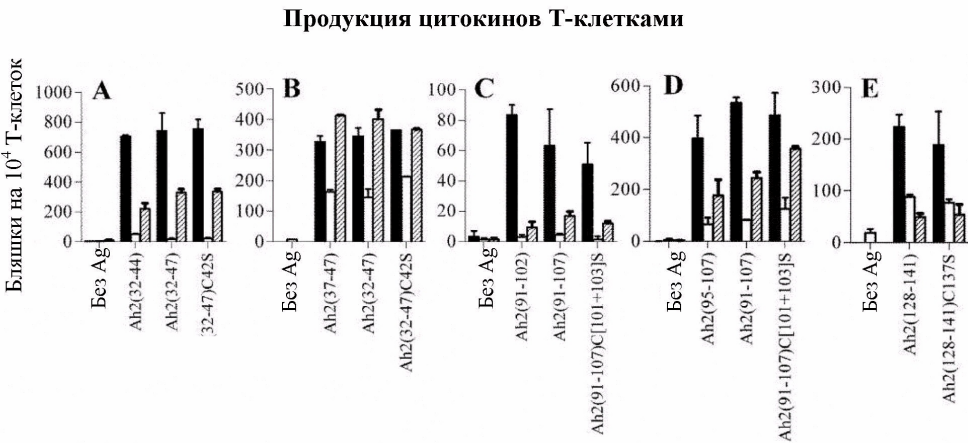
Фиг. 9



Фиг. 10

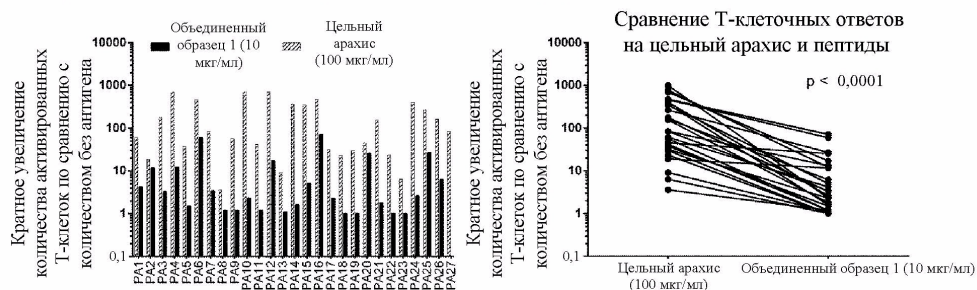


Фиг. 11

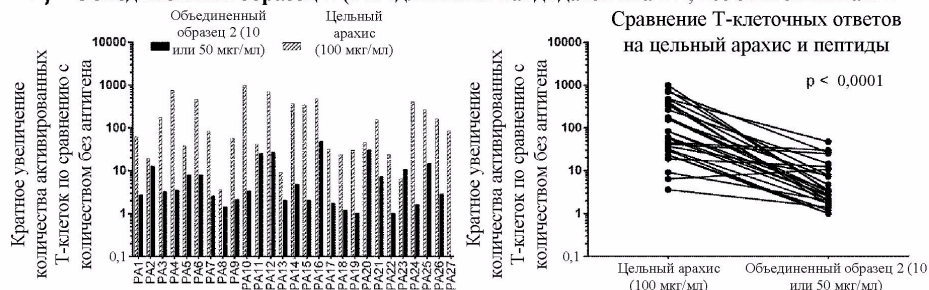


Фиг. 12

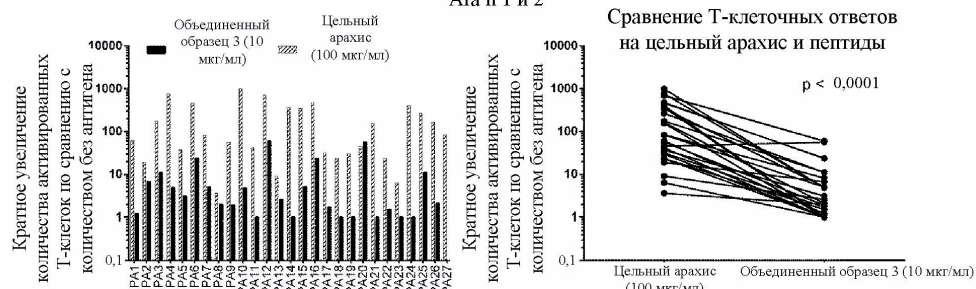
1) Объединенный образец 1 (7 х «длинных» кандидатов Ara h 1; все эпитопы Ara h 1



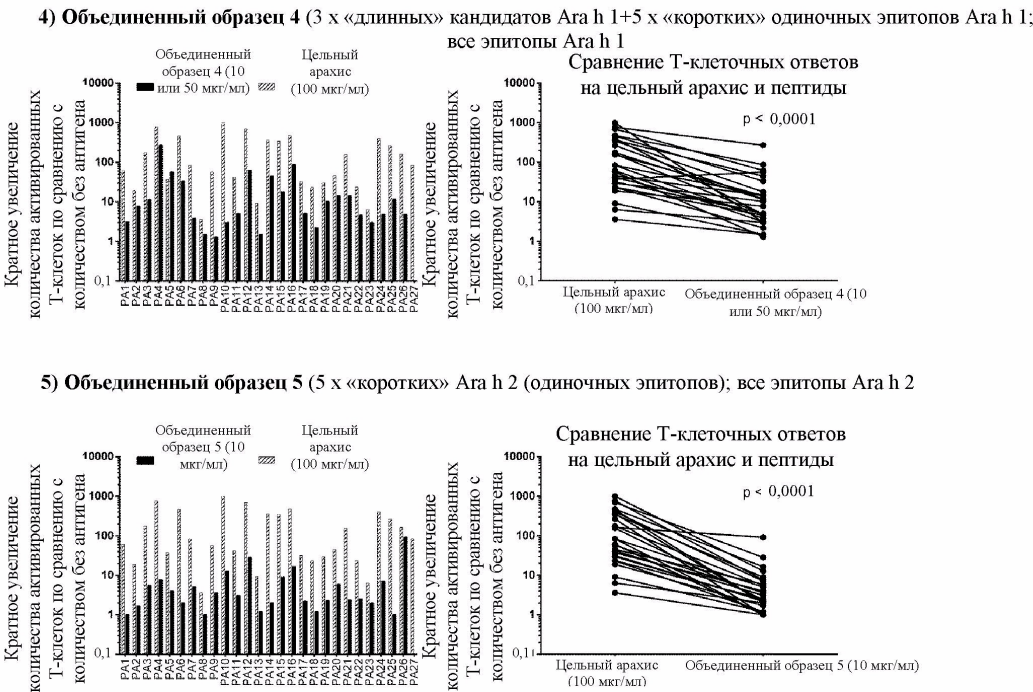
2) Объединенный образец 2 (3 х «длинных» кандидатов Ara h 2; все эпитопы Ara h 2



3) Объединенный образец 3 (7 х «длинных» кандидатов Ara h 1+3 х кандидатов Ara h 2; все эпитопы Ara h 1 и 2

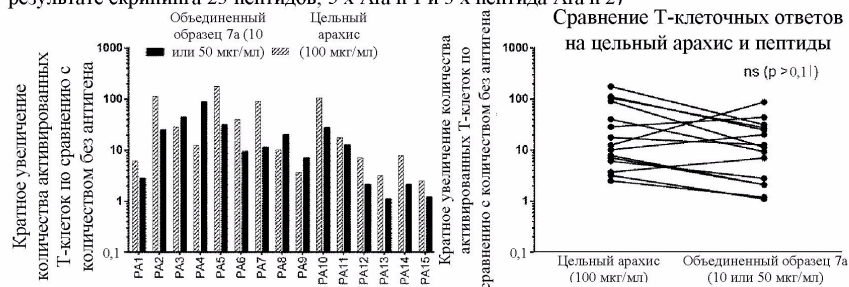


Фиг. 12 (продолжение)

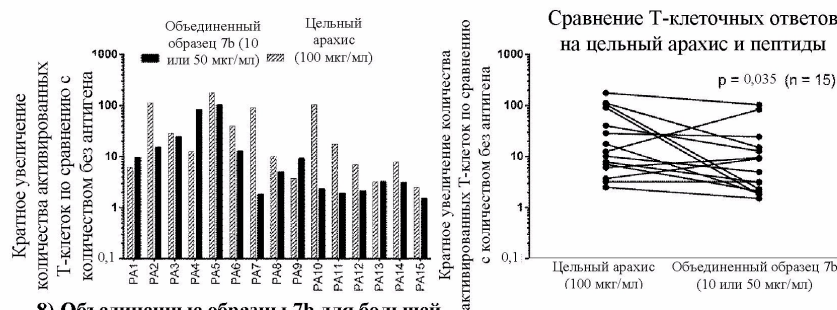


Фиг. 13

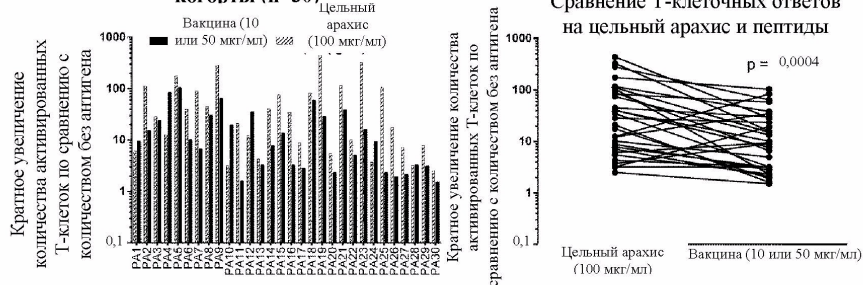
6) Объединенный образец 7а (улучшенный объединенный образец 8 пептидов, полученный в результате скрининга 23 пептидов; 5 x Ara h 1 и 3 x пептида Ara h 2)



7) Объединенный образец 7b (конечный объединенный образец 7 пептидов, полученный в результате скрининга 23 пептидов; 5 x Ara h 1 и 2 x пептида Ara h 2)

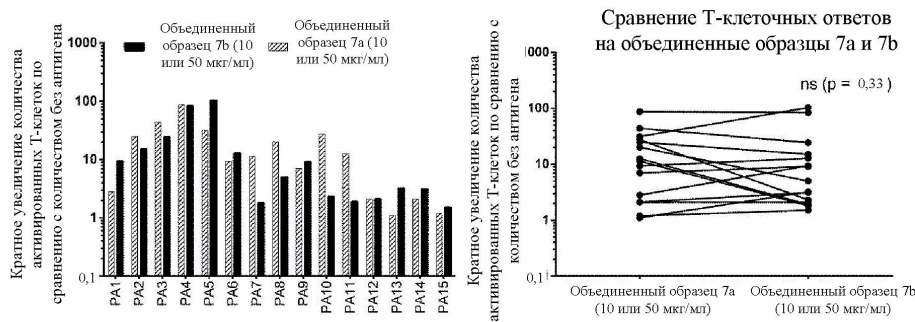


8) Объединенные образцы 7b для большей когорты (n=30)

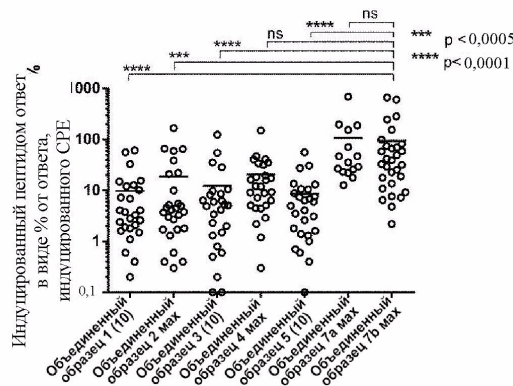


Фиг. 14

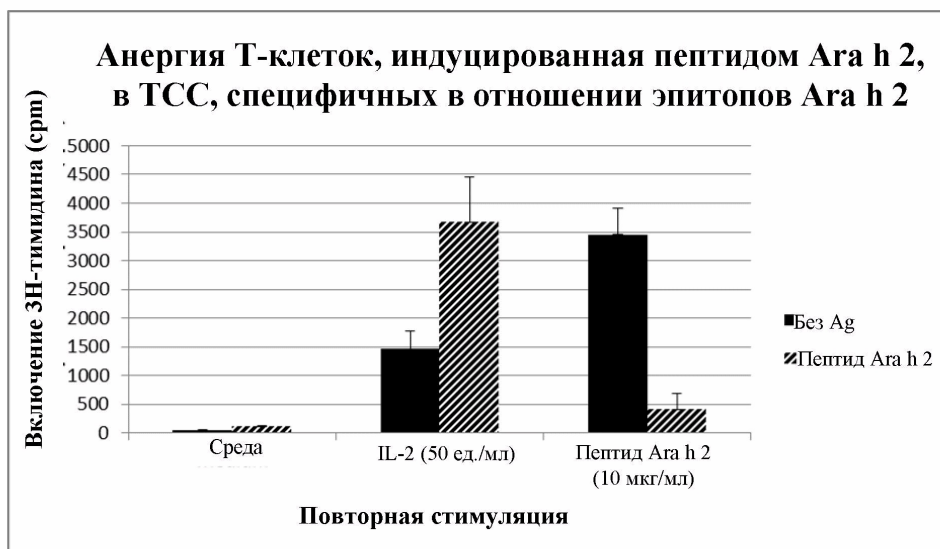
8) Не наблюдали значимые различия между объединенными образцами 7a и 7b (при сравнении парных данных; n=15 на группу; добавление 3-его пептида Aга h 2 не приводило к какому-либо преимуществу)



9) Объединенный образец 7b (и 7a) значительно лучше, чем большинство других протестированных объединенных образцов



Фиг. 15



Фиг. 16

